

VŠB – Technická univerzita Ostrava
Univerzitní studijní program

**Sledování velikostní distribuce, homogenity a stability
nanočástic připravených biosyntézou**

**Monitoring the size distribution, homogeneity and
stability of nanoparticles prepared using biosynthesis**

Autor:

Veronika Rybníčková

Vedoucí bakalářské práce:

Ing. Gabriela Kratošová, Ph.D.

Ostrava 2018

Zadání bakalářské práce

Student:

Veronika Rybníčková

Studijní program:

B3942 Nanotechnologie

Studijní obor:

3942R001 Nanotechnologie

Téma:

**Sledování velikostní distribuce, homogenity a stability nanočástic
připravených biosyntézou**
**Monitoring the size distribution, homogeneity and stability of
nanoparticles prepared using biosynthesis**

Jazyk vypracování:

čeština

Zásady pro vypracování:

Biosyntéza nanočástic získala již v nanotechnologiích svou pevnou pozici. Příprava nanočástic s využitím různých biologických materiálů skýtá řadu výhod – jedná se o metody nenáročné z pohledu ekonomického i ekologického. Na druhou stranu je určitou výzvou daný bionanotechnologický postup přípravy nanočástic ošetřit a optimalizovat tak, abychom získali vždy stejný produkt, tedy stabilní a homogenní nanočástice (pokud jsou v roztoku) nebo nanokompozit (pokud jsou nanočástice při syntéze kotveny na matici). Zajistit reprodukovatelnost dané bio(nano)technologie může být obecně časově náročnější, ačkoliv ne nemožné.

Cílem bakalářské práce je:

- 1) zpracovat literární rešerši vzhledem k zaměření práce
- 2) otestovat reprodukovatelnost již zavedeného postupu biosyntézy zlatých nanočástic
- 3) charakterizovat připravené nanočástice z pohledu jejich stability, velikosti a homogenity dostupnými analytickými metodami
- 4) vyhodnotit reprodukovatelnost postupu přípravy nanočástic na základě dosažených výsledků.

Seznam doporučené odborné literatury:

- 1) ATKINSON, Bernard a Ferda MAVITUNA. Biochemical engineering and biotechnology handbook. 2nd ed. Houndmills, Basingstoke, Hampshire: Macmillan, 1991. ISBN 9781561590124.
- 2) Green Biosynthesis of Nanoparticles – Mechanisms and Applications. Rai, M & Posten, C. (eds), CABI Publishing 2013, 248 s.
- 3) SOMASUNDARAN, Ponisseril. Encyclopedia of Surface and Colloid Science. 3rd ed. New York, USA: 2015 CRC Press. ISBN 9781466590458
- 4) články publikované v odborných časopisech


Formální náležitosti a rozsah bakalářské práce stanoví pokyny pro vypracování zveřejněné na webových stránkách fakulty.

Vedoucí bakalářské práce: **Ing. Gabriela Kratošová, Ph.D.**

Konzultant bakalářské práce: Ing. Veronika Holíšová


Datum zadání: 10.11.2017

Datum odevzdání: 21.05.2018



prof. Ing. Jaromír Pištor, CSc.
vedoucí katedry





Ing. Zdeňka Chmelíková, Ph.D.
prorektorka pro studium

Prohlášení:

Prohlašuji, že se hlásím k autorství bakalářské práce a souhlasím s jejím dalším využitím.

V Ostravě dne 27. 8. 2018

.....
jméno a příjmení studenta

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji že,

- jsem byla seznámena s tím, že na moji diplomovou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb., autorský zákon, zejména § 35 – užití díla v rámci občanských a náboženských obřadů, v rámci školních představení a užití díla školního a § 60 – školní dílo.
- беру на ве́домі, že Vysoká škola báňská – Technická univerzita Ostrava (dále jen „VŠB – TUO“) má právo nevýdělečně ke své vnitřní potřebě diplomovou práci užít (§ 35 odst. 3).
- souhlasím s tím, že diplomová práce bude v elektronické podobě uložena v Ústřední knihovně VŠB-TUO k nahlédnutí a jeden výtisk bude uložen u vedoucího diplomové práce. Souhlasím s tím, že údaje o kvalifikační práci budou zveřejněny v informačním systému VŠB-TUO.
- было с́jednáno, že s VŠB-TUO, v případě zájmu z její strany, uzavřu licenční smlouvu s oprávněním užít dílo v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona.
- было с́jednáno, že užít své dílo – diplomovou práci nebo poskytnout licenci k jejímu využití mohu jen se souhlasem VŠB-TUO, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly VŠB-TUO na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše).
- беру на ве́домі, že odevzdáním své práce souhlasím se zveřejněním své práce podle zákona č. 111/1988 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, bez ohledu na výsledek její obhajoby. V Ostravě dne 15. 5. 2014 jméno a příjmení studenta J. Kavky 3112, Frýdek-Místek adresa trvalého pobytu studenta

V Ostravě 27. 8. 2018

.....

jméno a příjmení studenta

.....

adresa trvalého pobytu studenta

Anotace

Bakalářská práce se zaměřuje na problematiku biosyntézy kovových nanočástic. Biosyntézy nanočástic patří mezi biotechnologické postupy a ty jsou spojeny s určitým úskalím, které spočívá v horší reprodukovatelnosti metody vzhledem k tomu, že se v technologickém procesu používá „živý“ biologický materiál. Práce obecně popisuje výhody a nevýhody biosyntéz, vysvětluje, co je to fyto-syntéza, a dále popisuje, jak lze ovlivňovat a optimalizovat podmínky fyto-syntézy, aby ve výsledku byly připraveny velikostně i tvarově homogenní nanočástice. V teoretické části jsou dále popsány hlavní analytické a zobrazovací metody, které se používají pro charakterizaci biosyntetizovaných nanočástic a pro posouzení jejich stability, pokud jsou připraveny ve formě koloidního roztoku. Praktické experimenty pak dokumentují, že pro fyto-syntézu zlatých nanočástic lze použít smrkové jehličí (lat. *Picea* sp.). V závěru bylo vyhodnoceno, že pilotní experimenty jsou opakovatelné a koloidní roztoky vykazují charakter stabilní koloidní soustavy.

Klíčová slova: biosyntéza, zlaté nanočástice, opakovatelnost, stabilita, homogenita

Počet stran: 52

Vzor citace: RYBNÍČKOVÁ V. *Sledování velikostní distribuce, homogenity a stability nanočástic připravených biosyntézou*. Ostrava, 2018. Bakalářská práce.
Vysoká škola Báňská - Technická univerzita Ostrava. Vedoucí práce Ing. Gabriela Kratošová, PhD.

Annotation:

Bachelor thesis focuses on biosynthesis of metallic nanoparticles. Nanoparticle biosynthesis is one of the biotechnological approach and these are associated with a certain pitfall, which is based on the worse reproducibility of the method, given that the "living" biological material is used in the technological approach. The thesis generally describes the advantages and disadvantages of biosynthesis, explains what phytosynthesis is, and further describes how the phytosynthesis conditions can be influenced and optimized to produce homogeneous nanoparticles. In the theoretical part, the main analytical and imaging methods used to characterize biosynthetic nanoparticles and to assess their stability when prepared as a colloidal solution are described. Practical experiments then document that for the phytosynthesis of gold nanoparticles, spruce needles (lat. *Picea* sp.) Can be used. In conclusion, it was assessed that pilot experiments were reproducible and colloidal solutions showed a stable colloid system.

Keywords: biosynthesis, gold nanoparticles, repeatability, stability, homogeneity

Number of pages: 52

Style of citation: RYBNÍČKOVÁ V. *Monitoring the size distribution, homogeneity and stability of nanoparticles prepared using biosynthesis*. Ostrava, 2018. Bachelor Thesis. Vysoká škola Báňská - Technická univerzita Ostrava. Supervisor Ing. Gabriela Kratošová, PhD.

Poděkování

Děkuji své vedoucí bakalářské práce Ing. Gabriele Kratošové, Ph.D. za její cenné rady, věnovaný čas, ochotu a obětavost, kterou mi během jejího zpracování poskytovala. Dále pak děkuji své konzultantce Ing. Veronice Holišové, za její rady, věnovaný čas a pomoc.

Obsah:

TEORETICKÁ ČÁST

1. Úvod	10
2. Biosyntéza a její zařazení mezi metody přípravy nanomateriálů	12
2. 1. Problematika biosyntézy	13
2. 2. Fytosyntéza nanočástic kovů	15
2.2.1. <i>Princip a mechanismus fytosyntézy nanočástic kovů</i>	15
2.2.2. <i>Vlastnosti nanočástic připravených fytosyntézou</i>	17
2.2.3. <i>Výhody a nevýhody fytosyntézy</i>	17
2.2.4. <i>Vliv reakčních podmínek na fytosyntézu</i>	18
2. 3. Princip stability fytosyntetizovaných nanočástic	20
2. 4. Metody použité pro studium morfologie, velikosti a stability fytosyntetizovaných nanočástic	22
2. 5. Vlastnosti nanočástic ušlechtilých kovů a jejich potenciální aplikace	24
3. Výběr biomasy pro fytosyntézu nanočástic zlata	26
4. Výsledky a diskuse	27
4.1. Vyhodnocení velikosti distribuce biosyntetizovaných zlatých nanočástic	29
4.2. UV – VIS spektrometrie	35
4.3. pH a zeta potenciál	40
5. Závěr	42
6. Literatura:	44

TEORETICKÁ ČÁST

1. Úvod

Nanotechnologie je oblast vědy, která představuje výzkum a technologický vývoj na atomové, molekulární a makromolekulární úrovni. Jedním ze směrů oboru nanotechnologie je vývoj nových nanomateriálů a studium jejich vlastností v nanorozměrech. Nanotechnologie se zabývají nanočásticemi a nanostrukturami, které mohou být definovány jako seskupení atomů v rozmezí velikosti cca 1-100 nm ^[1]. Tyto nanomateriály pak mají jedinečné fyzikální, chemické a biologické vlastnosti díky svému vysokému poměru povrchu k objemu ^[2].

Pro přípravu nanomateriálů bylo vyvinuto již několik chemických, fyzikálních a mechanických metod. Ovšem zelená syntéza nanočástic je jedním z velmi progresivních směrů v současnosti ^[3]. Aktuální problémy spojené s kontaminovaným životním prostředím přilákaly pozornost vědců směrem k metodám tzv. zelené chemie a zelené syntéze anorganických nanočástic za přítomnosti biologických systémů (biomas). Mezi biomasu můžeme řadit například bakterie, houby, řasy a rostliny, ale také biologické odpadní materiály. Syntéze, která pro přípravu nanostrukturovaných objektů využívá biologické systémy, říkáme biosyntéza. Oblast vědy zabývající se biosyntézou nanočástic kovů spadá mezi bionanotechnologie. Bionanotechnologie využívá poznatků ze zkoumání živé přírody, principy z oblasti biologie a biomateriálů k vytváření nových systémů v nanorozměrech ^[4].

Studium rostlinných extraktů a výluhů jako redukčních činidel kovových iontů pro syntézu jejich nanočástic je zajímavé díky jednoduchosti provedení a nízké ekonomické náročnosti. Výtažky rostlin přirozeně redukuje a stabilizují kovové nanočástice v jednom kroku ^[5]. Fytosyntézou byly připraveny například nanočástice Ag, Au, Pt a Pd různými rostlinnými extrakty a výluhy jak bude uvedeno dále. Mezi těmito nanočásticemi, jsou pak Ag a Au obzvláště atraktivní, vzhledem k jejich dalšímu uplatnění v katalýze ^[6] a desinfekci ^[7]. Nanočástice Ag a Au nacházejí rovněž potenciální uplatnění v léčbě rakoviny, v elektronice, v biosenzorech pro detekci virů a bakterií, dodávání léků, zobrazování (imaging), fototerapii ^[8] apod.

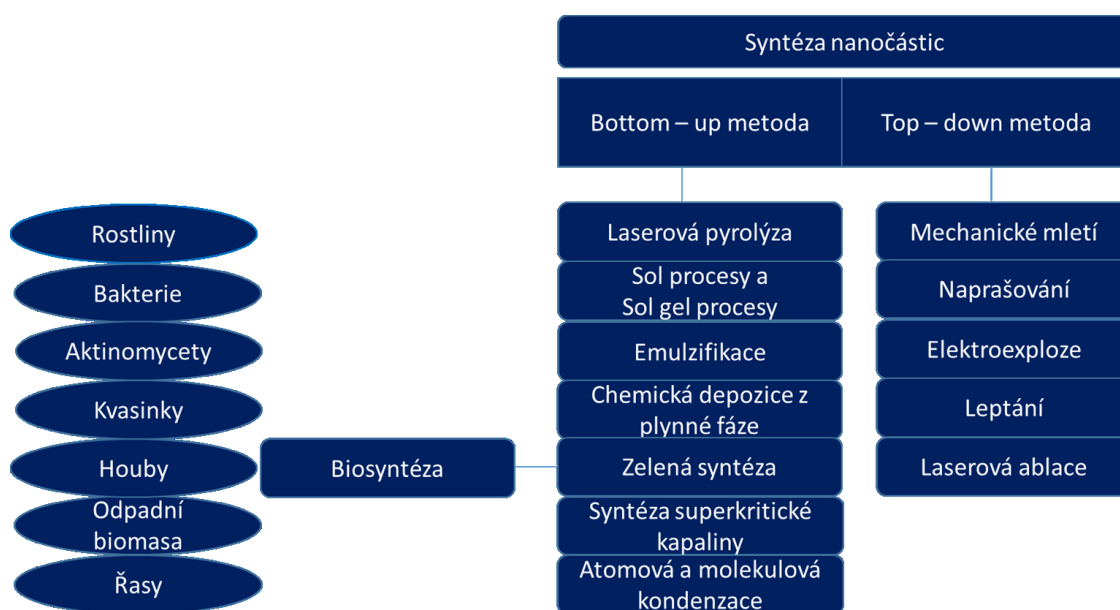
Ve své práci se zaměřuji teoreticky i prakticky na přípravu nanočástic působením fytochemikálií (flavonoidy, terpeny, atd.) z výluhů rostlin tzv. fytosyntézou a na následnou charakterizaci těchto nanočástic. Dalším diskutovaným parametrem je opakovatelnost bionanotechnologického postupu přípravy nanočástic a sledování stability nanočástic v roztoku. Bakalářská práce se konkrétně soustřeďuje na ověření opakovatelnosti fytosyntézy nanočástic zlata výluhem ze smrkového jehličí (lat. *Picea* sp.). Je zaměřena na

sledování velikostní distribuce a stability fyto-syntetizovaných zlatých nanočástic v časovém rozmezí 6 týdnů. Na základě pilotních testů byla diskutována opakovatelnost biotechnologického postupu přípravy koloidních roztoků zlatých nanočástic.

2. Biosyntéza a její zařazení mezi metody přípravy nanomateriálů

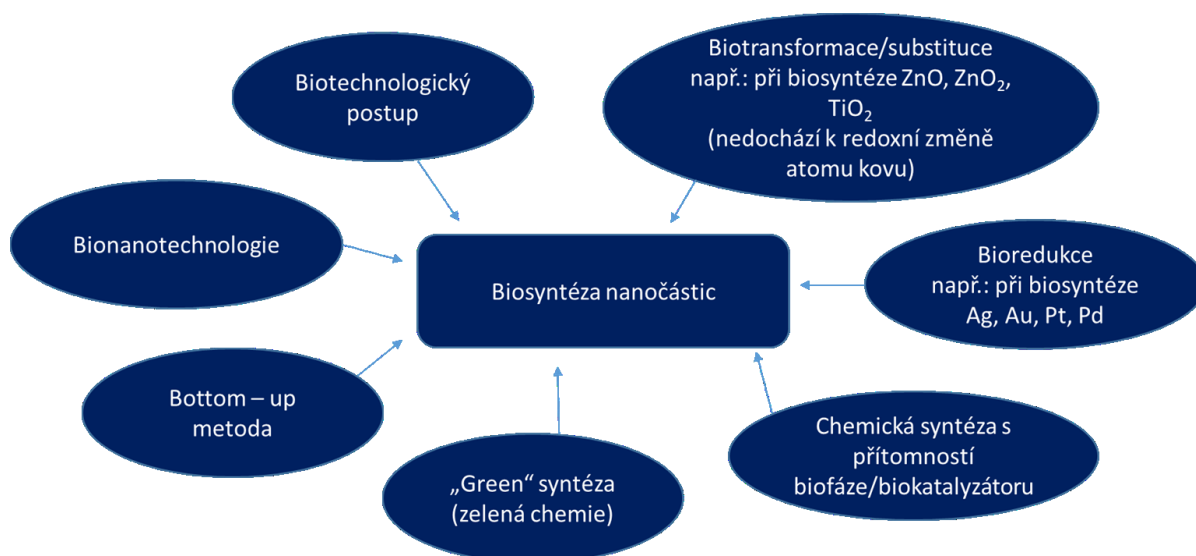
Metody pro přípravu nanočástic můžeme rozdělit na základě dvou principů. První „Top – down“ zahrnuje postupy jako je mletí materiálů se stabilizací vzniklých nanočástic, miniaturizace struktur konvenční a elektronovou litografií nebo chemické leptání či laserová ablace. Daný materiál je postupně zmenšován, až postupně dosáhne nanorozměrů. Největším problémem těchto metod je velká variabilita velikosti částic. Částice mají obvykle průměr v řádu desítek až stovek nanometrů. Tyto metody jsou velmi nákladné jak finančně, tak i energeticky^[1].

Druhý „Bottom – up“ princip zahrnuje postupy, kde jsou nanostruktury budovány z jednotlivých atomů, které se získají například chemickou či elektrochemickou redukcí kovu z jeho solného roztoku nebo kontrolovaným rozkladem metastabilních organokovových sloučenin. Klasty tvořené těmito atomy, se následně shlukují za tvorby nanostruktur. Tvar, velikost a stabilita nanočástic závisí na termodynamických a chemických podmínkách při samotné reakci. Díky tomu lze opakovaně připravit nanočástice s předem jasně definovanými vlastnostmi, a to i o velikostech v řádech jednotek nanometrů. Požadavky na velkovýrobu nanočástic s volitelným rozměrem vedly k tomu, že většina dnes průmyslově vyráběných nanočástic je připravována právě touto cestou^[9]. Jednou z možných „Bottom – up“ příprav anorganických nanočástic je i tzv. zelená syntéza nebo-li také biosyntéza, která je považována za ekologicky šetrnou metodu syntézy nanočástic (Obr 1).



Obr. 1: Dělení metod přípravy nanočástic kovů (převzato a upraveno z [10])

Při biosyntetických reakcích působí složky biomasy, jako redukční a stabilizační činidlo. Biomasa (biofáze) je souhrn látek tvořících těla všech organismů, jak rostlin, bakterií, sinic a hub, tak i živočichů. Může obsahovat látky, které mohou snižovat aktivační energii při syntéze kovových iontů a současně působit jako biokatalyzátor ^[11]. V biosyntetických metodách se již vyzkoušely redukční vlastnosti řady organismů. Zpočátku se hlavně díky zkušenostem z klasických biotechnologických procesů (remediace, rekultivace nebo biosorpce) používaly pro biosyntézu nanočástic bakterie ^[7]. Postupně byly využívány také další mikroskopické organismy, jako jsou mikroskopické vláknité houby, řasy, sinice a aktinomycety. Tyto organismy jsou zdrojem biomolekul s redukčním a stabilizačním účinkem, který se uplatňuje při formování nanočástic, a které buňky produkují po kontaktu s potenciálně nebezpečným kovovým kationtem ^[12]. Jedná se tedy v podstatě o obranný mechanismus, který je možné cíleně využívat v bionanotechnologiích pro cílenou produkci nanočástic. V některých případech při biomineralizaci dochází k formování nanostruktur záměrně, např. u magnetotaktických bakterií, nebo rozsivek ^[10, 13]. Biosyntéza nanočástic se dá označit různými pojmy, které jsou zobrazeny v Obr.2.



Obr. 2: Možná označení procesu biosyntézy anorganických nanočástic s využití biofáze

2. 1. Problematika biosyntézy

Jak již bylo zmíněno v kapitole výše, existuje veliké množství organismů, které mohou být využity pro biosyntézu nanočástic kovů. Díky tomu je možné připravit širokou škálu nanočástic s různými chemickými a fyzikálními vlastnostmi, jako jsou velikost, tvar nebo krystalinita, také s různou povrchovou funkcionalizací širokou škálou biomolekul. Živé buňky představují komplexní systém s tisíci molekulami obsahujícími různé funkční

skupiny, z nichž každá může určitým způsobem ovlivňovat redukci a následnou stabilizaci kovu. Pochopení reakčních mechanismů podílejících se na biosyntéze nanočástic představuje cestu ke kontrole vlastností těchto nanočástic a následné reprodukovatelnosti metody a optimalizaci. Výzkum a pochopení těchto mechanismů může být snadnější u vyšších rostlin. Problematictější je rozluštění mechanismu biosyntéz s mikroorganismy, protože genom mikroorganismů je daleko složitější [7].

Optimalizace kultivace dané biomasy, pokud hovoříme o mikroorganismech, může být rovněž velmi složitá a časově náročná. Získání rostlinné biomasy je podstatně jednodušší. Navíc v poslední době se objevuje stále více publikací, které pro biosyntézu nanočástic využívají odpadní produkty/biomasy z potravinářského nebo zemědělského průmyslu. Použitá biomasa může sloužit pro extracelulární syntézu nanočástic, které jsou následně uvolněny a stabilizovány v roztoku [14] nebo může navíc sloužit jako matrice, na které jsou po biosyntéze nanočástice ukotveny [15].

Reprodukovatelnost a opakovatelnost je obecný problém biotechnologických postupů, takže i biosyntéz. Práce s živými organismy (biomasou) může být komplikovaná z pohledu určité nestability z pohledu dané biomasy a její odezvy na proměnné externí faktory jako například teplota, vzdušná vlhkost, pH prostředí, atd. Tyto faktory pak mají přímý vliv na kvalitu biomasy a kvantitu obsahových látek [7]. První je nutné říci, co vlastně pojmy reprodukovatelnost a opakovatelnost znamenají. Opakovatelnost představuje měření nebo postup, které probíhají za stejných podmínek, stejným pracovníkem a stejným přístrojem s tím, že pokud jej opakujeme, dostáváme stejné hodnoty – v našem případě lze říci, že produkt (nanočástice) stejných charakterových vlastností. Pokud bychom změnili v procesu pracovníka, místo nebo přístroj, pak bychom zjišťovali reprodukovatelnost metody [16].

Poznatky, které získáváme v rámci bionanotechnologických postupů je možno zobecňovat s určitou obezřetností. Za jiných podmínek mohou mít stejné změny parametrů různé výsledky, závislé na stavu nebo druhu biomasy. Nejedná se přitom pouze o možné vlivy změn fyzikálních parametrů na souhrnný mechanismus biosyntézy, ale i například o přímý vliv na fyziologický stav biomasy a její „paměť“. Změny parametrů obvykle způsobují nevratné změny jak v kvalitě, tak i v kvantitě výsledků měření a může dojít k nastartování jiných reakčních mechanismů. Proces je tedy nutné sledovat dynamicky [17]. Jinými slovy, kultivací biomasy (druhově, ale i rodově stejné) za jiných podmínek, můžeme dostat charakterově odlišné nanočástice.

Jednou z velice důležitých vlastností je stabilita nanočástic připravených biosyntézou a to i z dlouhodobého hlediska. Stabilita zlatých nanočástic biosyntetizovaných rostlinami *Lippia citriodora*, *Salvia officinalis*, *Pelargonium graveolens* a *Punica granatum*, kde prekurzorem byla 1 mM HAuCl₄, byla charakterizována sledováním zeta potenciálu po dobu 4 týdnů ^[16]. Ve stanovené době se zeta potenciál zlatých nanočástic až na malé odchylky nezměnil (Tab. 1). To značí určitou stabilitu systému a malou náchylnost k tvorbě agregátů.

Tab. 1: Hodnoty zeta potenciálu biosyntetizovaných nanočástic zlata [18]:

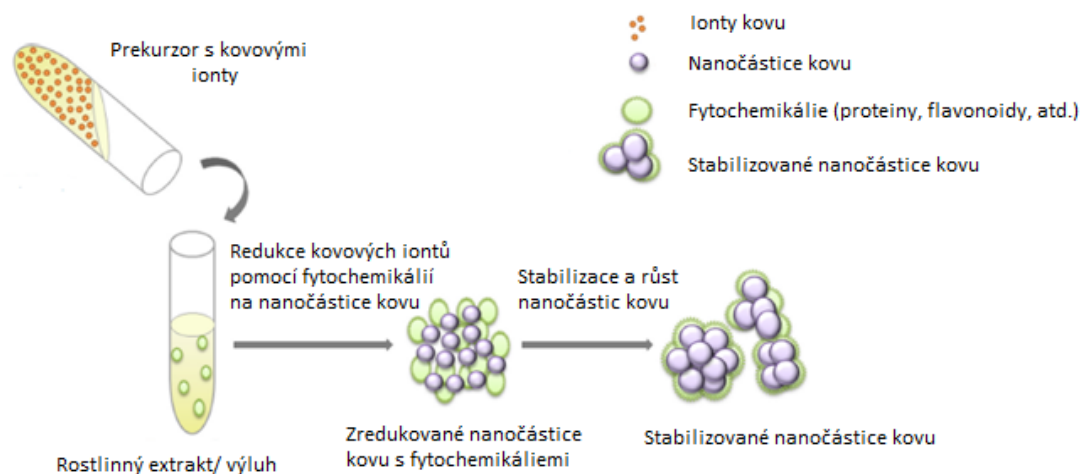
Použitá biomasa	Zeta potenciál [mV]
<i>Lippia citriodora</i>	$-17,9 \pm 0,3$
<i>Salvia officinalis</i>	$-20,9 \pm 1,0$
<i>Pelargonium graveolens</i>	$-23,9 \pm 2,0$
<i>Punica granatum</i>	$-12,0 \pm 0,4$

2. 2. Fytosyntéza nanočástic kovů

Pro potřeby bakalářské práce budou kapitoly dále věnované fytosyntéze nanočástic kovů. Pro fytosyntézu nanočástic kovů se využívají rostliny, jejich části nebo i rostlinné odpadní materiály. Následně jsou používány v podobě extraktu nebo výluhu, který je smíchán s kovovými ionty v roztoku prekurzoru. Je obecně předpokládáno, že na fytosyntéze se mohou podílet především antioxidanty, cukry a proteiny, přestože ještě nebylo dosaženo přesného vědeckého vysvětlení celého procesu ^[7].

2.2.1. Princip a mechanismus fytosyntézy nanočástic kovů

Základním principem je reakce rostlinných metabolitů obsažených v rostlinném extraktu/výluhu s kovovými ionty v roztoku prekurzoru (Obr. 3). Prekurzorem se rozumí rozpustná sůl kovu, jehož nanočástice chceme připravit. Například pro přípravu Au nanočástic se nejčastěji využívá roztok HAuCl₄ ^[19], Ag nanočástice se nejčastěji připravují z roztoku AgNO₃ ^[20], paladiové z PdCl₂, nebo platinové z H₂PtCl · 6H₂O ^[21]. Ne vždy dochází k redoxnímu ději (k bioredukci), ale pozorujeme také transformaci daného kovu do nanostrukturované sloučeniny, ve které je oxidační stav kovu zachován, např. při fytosyntéze ZnO z prekurzoru Zn(NO₃)₂ ^[22, 23].



Obr. 3: Princip fytosyntézy nanočástic kovu (převzato a upraveno [24])

V rostlinném extraktu/výluhu jsou zastoupeny metabolity označované obecně také jako fytochemikálie, charakteristické pro každou danou rostlinu. Jejich složení i poměr je unikátní a různé funkční skupiny přítomných biomolekul pak ovlivňují mechanismus fytosyntézy, a tím výsledný charakter (tvar a velikost) vzniklých nanočástic [10].

Dříve se vědci domnívali, že za mechanismem fytosyntézy stojí rostlinné enzymy. V dnešní době je již známo, že bioredukce a stabilizace neprobíhá pomocí rostlinných enzymů v případě, že příprava extraktů nebo vodných výluhů probíhá okolo 90 °C a veškeré enzymy jsou při této teplotě degradovány [25]. V návaznosti na toto zjištění se objevila teorie, že do mechanismu vstupují pravděpodobně fytochemikálie, jako jsou terpenoidy, fenoly, polysacharidy, seskviterpeny a flavonoidy [7]. Sekundární metabolity, jako jsou bioflavonoidy, mohou redukovat tetrachlorzlatitou kyselinu, ale karboxylová skupina, která je přítomna například v proteinech, může působit jako surfaktant, který obalí zlaté nanočástice a elektrostaticky je stabilizuje. Dále se zjistilo, že oxidace polysacharidu, konkrétně hydroxylové skupiny na skupinu karbonylovou, hraje důležitou roli v redukci solí kovů na nanočástice [26].

Infračervená spektroskopie (FTIR) byla použita za účelem identifikace funkčních skupin přítomných v extraktu z listů *Satureja hortensis* [20], které působí jako redukční činidla a stabilizátory ve fytosyntéze stříbrných nanočástic. Spektroskopie odhalila zapojení karboxylových, hydroxylových a amidových skupin podílejících se na fytosyntéze stříbrných nanočástic. Navíc flavonoidy a fenolové sloučeniny přítomné v extraktu listů jsou silnými redukčními činidly. Karboxylová skupina přítomná v proteinech může hrát roli jako surfaktant pro stabilizaci stříbrných nanočástic.

Ke stejným závěrům došli vědci analýzou infračervené spektroskopie roztoku zlatých nanočástic fyto-syntetizovaných extraktem z plodu *Genipa americana* [27]. Zjistili, že na redukci zlatých iontů se podílejí fenoly, karboxylové kyseliny, proteiny a aminy.

2.2.2. Vlastnosti nanočástic připravených fyto-syntézou

Jak již bylo řečeno, rostlinné metabolity ovlivňují náboj, rozměr, toxicitu či biokompatibilitu fyto-syntetizovaných kovových nanočástic. Velkou výhodou biosyntézy obecně je nepoužívání toxických rozpouštědel a stabilizátorů, ale biomolekul, příp. jejich reziduí. Nemenší výhodou je i nízká cena celého postupu přípravy nanočástic. Pokud připravujeme nanočástice stříbra pomocí rostlin, můžeme říct, že v určitých aspektech, např. s ohledem na obsah toxických reziduí a biokompatibilitu, mohou mít lepší vlastnosti než nanočástice syntetizované konvenčními fyzikálními či chemickými metodami [28].

2.2.3. Výhody a nevýhody fyto-syntézy

Je známo, že rostliny mají svoji určitou kapacitu pro bioredukci kovových iontů díky rostlinné specifické metabolické cestě. Kromě celkové kapacity pro bioredukci kovových iontů je ale také důležitá distribuce fyto-syntetizovaných nanočástic v rostlině, která upozorňuje na to, že různé části rostliny mohou mít různou schopnost redukovat ionty kovů. Nanočástice kovů byly nalezeny v listech, stonku, kořeni a buněčných stěnách rostlin o koncentraci 0,4% [29]. Je zajímavé, že místa s nejvyšším výskytem nanočástic byla v chloroplastech, oblastech s vysokým obsahem redukcijících cukrů (glukóza, fruktóza) [30]. Zdá se, že tyto cukry by mohly být odpovědné za redukci kovových iontů.

Fyto-syntéza postrádá složité a více-krokové procesy (např. mikrobiální izolaci, kultivaci, či údržbu). V tom spočívá jedna z výhod oproti biosyntéze s mikroorganismy. Proces fyto-syntézy kovových nanočástic může probíhat na živé či inaktivované biomase [31]. Stabilizace probíhá pomocí fotochemikálií, a to prostřednictvím iontové nebo elektrostatické interakce mezi kovovým komplexem a funkčními skupinami obsaženými v biomase. Pro kvantitativní průběh biosyntézy je dobré zajistit, aby použitá biomasa byla homogenní s ohledem na strukturu, a tím na biomolekuly potenciálně využitelné v reakci. Bylo prokázáno, že fyto-syntéza je rychlejší než syntéza za pomoci mikroorganismů a připravené nanočástice jsou stabilnější [10]. Díky použití technik kultivace pletiv rostlin, jejich optimalizace a následnému zpracování, je možné takto syntetizovat kovové nanočástice v

průmyslovém měřítku ^[32]. Tabulka 2 uvádí několik příkladů fyto-syntetizovaných kovových nanočástic.

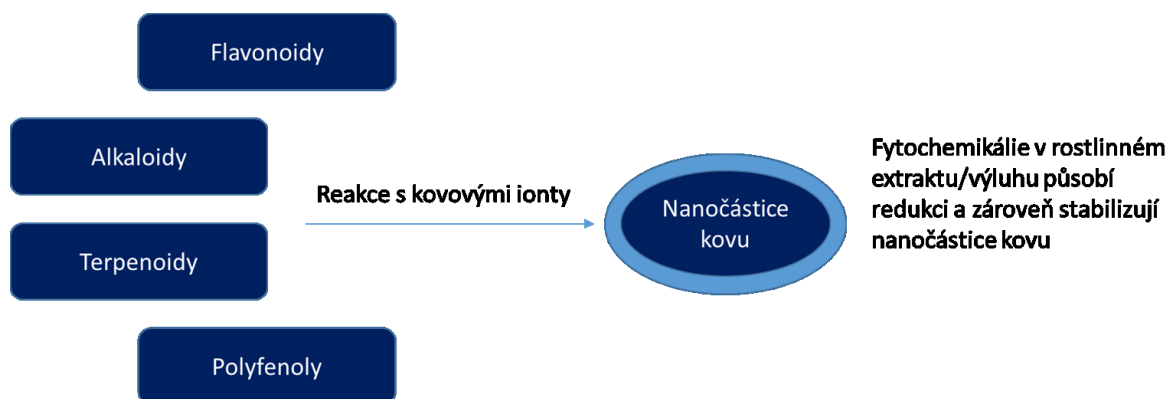
Tab. 2: Vybraní rostlinní zástupci použití pro fyto-syntézu kovových nanočástic

Latinský název	Nanočástice	Velikost nanočástic [nm]	
<i>Azadirachta indica</i>	Ag	50	[33]
<i>Emblica officinalis</i>	Ag	10 – 20	[34]
	Au	15 – 25	[34]
<i>Cinnamomum camphora list</i>	Ag	55 – 80	[35]
<i>Ocimum tenuiflorum</i>	Ag	25 – 40	[36]
<i>Zingiber officinale</i>	Au	10	[37]
<i>Olea europaea</i>	Au	50 – 100	[38]
<i>Salix alba</i>	Au	50 – 80	[39]

Nevýhodou fyto-syntézy z rostlinných extraktů může být morfologická různorodost nanočástic. Existují však také publikace, které ukazují různé typy rostlin, které vytváří kovové nanočástice stejné velikosti a stejného tvaru. Příkladem je *Satureja hortensis*, která při biosyntéze vytváří nanočástice převážně sférického tvaru a velikosti od 2,9 po 3,4 nm ^[20, 30]. Velikost částic i jejich tvarovou homogenitu lze ovšem ovlivňovat vnějšími reakčními podmínkami, jako jsou pH, teplota nebo expoziční čas, jak bude popsáno blíže v další podkapitole.

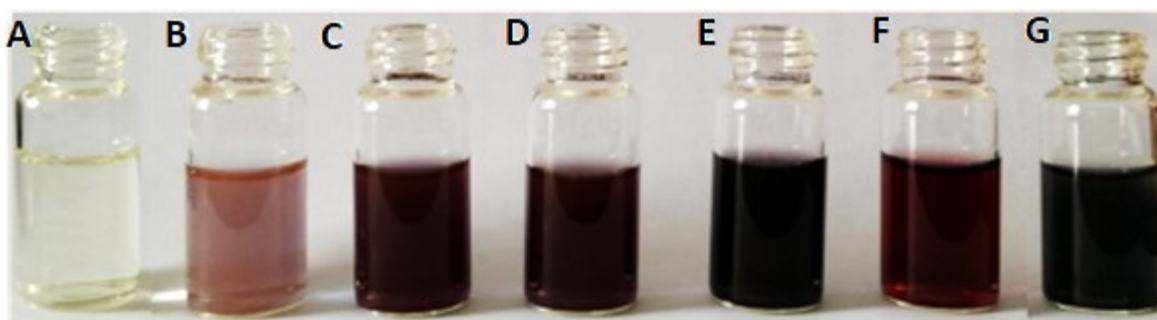
2.2.4. Vliv reakčních podmínek na fyto-syntézu

Zásadním faktorem ovlivňujícím fyto-syntézu, je nejen druh vybrané biomasy, ale také její množství resp. poměr rostlinná biomasa/prekurzor kovu. Větší množství biomasy znamená i větší množství metabolitů a biomolekul, které mají vliv na množství i kvalitu výsledných nanočástic (Obr. 4). Reakčními podmínkami jsou i klíčové faktory jako koncentrace prekurzoru kovu a doba kontaktu biomasy s prekurzorem kovu (expoziční čas), pH, teplota, intenzita a typ ozáření, atd. Mícháním směsi také můžeme ovlivnit velikost vznikajících nanočástic. Pokud se směs prekurzoru s biomasou nemíchá, vznikají podstatně menší částice ^[10].



Obr. 4: Fytochemikálie podílející se na fyto syntéze nanočástic kovu (převzato a upraveno z [10])

Teplota a pH může zásadně ovlivňovat velikost a homogenitu nanočástic. Bylo prokázáno že, čím nižší je pH, tím menší jsou částice ^[40]. Dále pak při růstu teploty se mohou nanočástice zvětšovat ^[41]. Vliv těchto dvou faktorů, tedy pH a teploty, byl sledován při fyto syntéze nanočástic zlata pomocí extraktu ze sušeného zeleného pepře smíchaného s prekurzorem HAuCl_4 . Bylo připraveno celkem 7 kapalných směsí o hodnotách pH 2, 4, 6, 8, 10, 12 a 14 (Obr. 5). Po 24 hodinách byl pozorován vizuální rozdíl roztoků a byla naměřena absorbance na UV-VIS spektrometru. Nanočástice nevznikly ve vzorku v prostředí s pH 2. Při pH 4 se fyto syntetizovaly zlaté nanočástice 10 hodin s maximální absorpční vlnovou délkou 580 nm. Se zvyšujícím se pH docházelo k zbarvení rychleji a maximální absorpční vlnová délka klesala až na 552 nm. Při pH 14 se vzorek zbarvil asi za 20 minut. Shrnutí výsledku bylo jednoznačné, s rostoucím pH vzorku se roztoky zbarvily rychleji a zvyšovala se jejich absorbance ^[40].

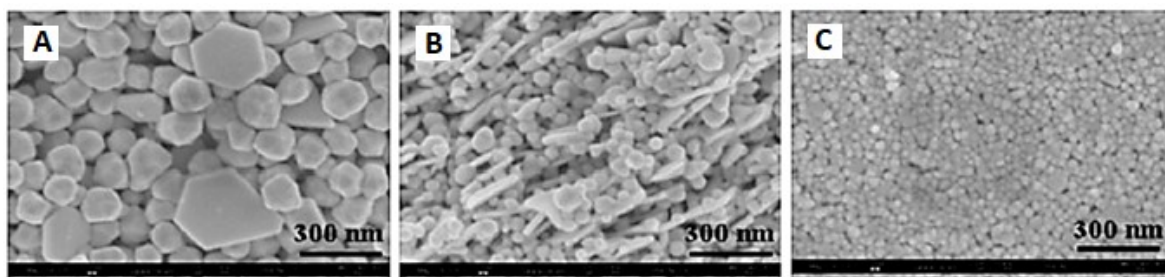


Obr. 5: Experimentální potvrzení závislosti velikosti nanočástic Au na pH [(A) 2 pH, (B) 4 pH, (C) 6 pH, (D) 8 pH, (E) 10 pH, (F) 12 pH, (G) 14 pH] ^[40]

Experiment se sušeným zeleným pepřem, ve kterém byla zkoumána závislost na teplotě, byl proveden v rozmezí teplot 30 °C – 80 °C. Bylo zjištěno, že při vyšších teplotách

dochází k rapidnímu poklesu rychlosti tvorby nanočástic ^[40]. Při teplotě 30 °C byla velikost nanočástic 35 nm, zatím co při teplotách vyšších byla velikost částic okolo 6 nm.

Snímek pořízený skenovacím elektronovým mikroskopem (SEM) přesně ukazuje, jak závisí výsledná morfologie nanočástic na teplotě při fyto syntéze. Zatím co u teplot 25 °C a 60 °C byla tvarová rozmanitost zlatých nanočástic větší (trojúhelníky, pentagony, hexagony), při teplotě 95 °C už zde byly pouze sférické částice ^[41]. Velikost částic se pohybovala od 5 nm do 300 nm.



Obr. 6: SEM snímek zlatých nanočástic fyto syntetizovaných 1 mM HAuCl₄ a 5% výluhem z listů *Diopyros kaki* za různých teplot [(A) 25 °C, (B) 60 °C, (C) 95 °C] ^[41]

Příkladem, jak je fyto syntéza ovlivňována koncentrací prekursoru, je experiment biosyntézy nanočástic zlata extraktem z listů *Cocculus hirsutus* z prekursorů 0,25 mM HAuCl₄ a 2,5 mM HAuCl₄. Díky rozdílné koncentraci prekursoru se zlaté nanočástice lišily svým tvarem, množstvím i velikostí. U vzorku s menší koncentrací prekursoru se fyto syntetizovali sférické zlaté nanočástice, ve velkém počtu s průměrnou velikostí mezi 15 až 30 nm. Na rozdíl od druhého vzorku, kde byla koncentrace prekursoru vyšší a fyto syntetizovaly se nanočástice trojúhelníkového tvaru a sférické zlaté nanočástice. Jejich velikost byla okolo 40 -120 nm ^[42].

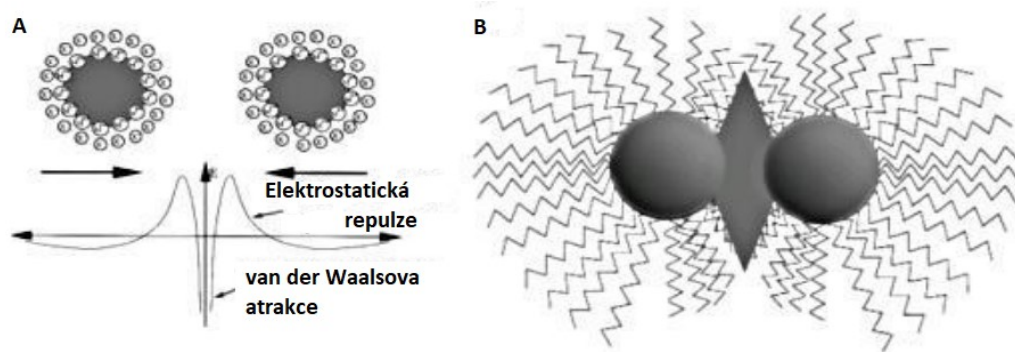
2. 3. Princip stability fyto syntetizovaných nanočástic

Pod pojmem stabilita se rozumí schopnost nanočástic odolávat vlivům, které by vedly ke změně jejich morfologie, homogenity a velikosti. Díky velkému specifickému povrchu, který je silně reaktivní, je nutné zabránit vlivům vedoucím k agregaci.

Z obecného hlediska mezi dvě základní metody patří sterická stabilizace a stabilizace elektrickou dvojvrstvou. Za sterické stabilizátory se považují látky, které jsou schopné se silně adsorbovat na povrch koloidních nanočástic. Nejčastěji jsou používány makromolekulární látky a povrchově aktivní látky. Ze zástupců polymerů jsou to například polyvinylpyrrolidon (PVP), želatina, polyvinylalkohol (PVA), polyvinylglykol (PEG) a

další. Povrchově aktivní látky užívané ke stabilizaci jsou například dodecylsulfát sodný (SDS), Tween 40 nebo Tween 80 [43].

Častým způsobem zabránění agregace nanočástic ve vodných roztocích je stabilizace elektrickou dvojvrstvou. Roku 1922 Stern a kol. navrhli teorii struktury elektrické dvojvrstvy, ve které jsou zahrnuty neelektrické interakce iontů a konečné rozměry iontů. Dle této teorie jsou adsorpčními a elektrostatickými silami přitahovány ionty opačného znaménka k vnitřní vrstvě iontů. Při přiblížení dvou stejně nabitých povrchů se začnou jejich elektrické dvojvrstvy navzájem prostupovat. Dojde ke změně rozložení iontů a hustoty náboje s čímž souvisí změna potenciálu. Při zmenšování mezery mezi povrchy dojde k desorpci iontů a vzroste Gibbsova energie systému. Následkem toho vzniknou odpudivé síly mezi jednotlivými nanočásticemi, které brání koagulaci a stabilizují roztok [44]. Je tedy nutné užití surfaktantů ke stabilizaci nanočástic. V některých případech je možné pro redukci a stabilizaci použít stejnou chemikálii v čistě chemických syntézách.



Obr. 7: Elektrostatická stabilizace nanočástic pomocí elektrické dvojvrstvy (A), sterická stabilizace nanočástic (B) [45]

V případě fyto-syntézy kovových nanočástic není nutné použít žádných dalších stabilizátorů. Při fyto-syntéze jsou nanočástice stabilizovány metabolity obsaženými v rostlinách. Existují publikace, které popisují dodatečné zvýšení a optimalizaci stability nanočástic připravovaných biotechnologickou cestou například pomocí guarové gumy [46] nebo Daxau 19 [47].

2. 4. Metody použité pro studium morfologie, velikosti a stability fytosyntetizovaných nanočástic

2.4.1. Transmisní elektronová mikroskopie (TEM)

Metoda transmisní elektronové mikroskopie je velmi užitečnou a v oblasti studia nanočástic prakticky nenahraditelnou zobrazovací i analytickou metodou, která nám určí velikost a homogenitu jednotlivých nanočástic a podá informaci o stabilitě v tom smyslu, že můžeme pozorovat, zda jsou v daném systému shluky nanočástic či nikoliv. Přidanou hodnotou této metody je fakt, že lze nanočástice zobrazit v tmavém poli a pomocí selektivní difrakční elektronové metody (SAED) ověřit krystalický charakter zobrazovaných částic. Analýza pevných vzorků touto metodou je nedestruktivní, ale je třeba ultratenkých vzorků, které jsou zároveň zbaveny vody ^[48]. Kapalně vzorky, případně prášky dispergované v kapalině se připravují na mřížku (grid), a po té se nechají zaschnout, aby se odstranila kapalná fáze. Mikroskopy, které využívají elektrony pro zobrazení, jsou navíc díky softwarovému vybavení schopny zpracovat velikostní distribuci a vyhodnotit velikost částic v „živém“ i archivovaném obraze.

TEM se skládá z osvětlovací a zobrazovací soustavy, ze zdrojové a ovládací soustavy, doplněné o vakuovou trubici. Princip činnosti je následující – zrychlený usměrněný paprsek elektronů emitovaný zdrojem (kovovou katodou) je veden vakuem. K urychlení proudu elektronů dochází průchodem tzv. elektronové čočky (elektrické pole kondenzoru nebo magnetické pole cívk). Takto je svazek fokusován na preparát, který je dostatečně tenký, aby mohly elektrony projít skrz něj. Elektrony dále procházejí objektivem a tvoří první elektronový obraz. Část tohoto obrazu je zvětšena projekтивem a obraz je promítán na stínítko pokryté vrstvou luminoforu, nebo se zachytí na fotografické desce případně filmu. V současné době můžeme obraz snímat i kamerou a následně manipulovat snímky v počítači ^[49].

2.4.2. UV-VIS spektroskopie

Mezi metody UV-VIS spektroskopie patří metody využívající absorpci elektromagnetického záření látkami v oblasti ultrafialového a viditelného spektra. Měřením jsou získána absorpční spektra, která jsou graficky vyjádřena jako závislost absorpance na vlnové délce. Molekuly absorbují elektromagnetické záření a dochází ke změně jejich elektronového stavu – elektronovým přechodům. Pohlcením určitého kvanta fotonů, charakteristického pro danou molekulu, přechází molekula ze základního stavu do stavu excitovaného. Hovoříme tedy o absorpci. Při vyzáření tohoto kvanta elektronů hovoříme o

emisi. Výsledné spektrum má pásový charakter, protože většinou není možné určit jednotlivé přechody ^[17].

Pro vyhodnocení výsledků jsou důležitými parametry výška píku, šířka píku a maximální absorpční vlnová délka. Velikost nanočástic pak souvisí s maximální absorpční vlnovou délkou, kde se vzrůstající velikostí nanočástic roste i vlnová délka. Výška a šířka píku při dané charakteristické vlnové délce udává koncentraci a distribuci nanočástic v roztoku, tj. zda jsou nanočástice velikostně homogenní či nikoliv. Ideálním stavem je pík úzký a vysoký. V takovém případě máme úzkou distribuční křivku s velkým množstvím nanočástic jednotné velikosti ^[50].

Po přidání roztoku 2 mM HAuCl_4 k rostlinnému esenciálnímu oleji *Menthapiperitum*, byla pozorována barevná změna směsi na rubínově červenou, což indikovalo fyto syntézu zlatých nanočástic. UV-VIS metoda ukázala nejvyšší absorpci při vlnové délce 530 nm ^[51].

Při použití *Genipa americana* s roztokem HAuCl_4 byl maximální pík absorbance pozorován při 590 nm ^[52]. Spektrum bylo po 1 hodině proměřeno znovu a pík se posunul na vlnovou délku 535 nm. Stanovená velikost nanočástic zlata byla 15 – 40 nm. Při dalším měření po 120 hodinách se neukázala žádná změna. Žádná další změna nenastala ani po dobu 6 – 7 měsíců při pokojové teplotě a nebyly pozorovány ani žádné příznaky aglomerace nanočástic zlata.

2.4.3. Zeta potenciál

Na rozhraní nanočástice/roztok vzniká elektrická dvojvrstva jako důsledek schopnosti elektricky nabitého povrchu nanočástice přitahovat opačně nabité ionty z roztoku. Vrstvu kapaliny obklopující nanočástici můžeme rozdělit na vnitřní (Sternovu) vrstvu, kde jsou ionty silně vázané a tvoří hydratační obal, a vnější (difúzní) vrstvu. Zde jsou ionty slaběji vázané a tvoří pohyblivou část hydratačního obalu. Uvnitř vnější difúzní vrstvy existuje teoretická hranice, kde ionty a částice tvoří stabilní jednotku. Pokud se pohybuje částice, pak se pohybují i ionty v rámci hranice spolu s ní. Tato hranice se nazývá rovina skluzu nebo povrch hydrodynamického smyku. Na této hranici vzniká zeta potenciál, který udává celkovou stabilitu nanočástic ^[53].

Obecně se jako hranice mezi stabilním a nestabilním roztokem zpravidla uvádí +30 nebo -30 mV. Pokud mají nanočástice v roztoku záporný nebo kladný náboj vně tyto limitní hodnoty, budou se nanočástice vzájemně odpuzovat a nebude docházet k agregaci.

Měřením zeta potenciálu u nanočástic stříbra fytosyntetizovaných extraktem z rýže v roztoku s vyšším pH bylo nalezeno více stabilních částic než v roztoku s nižším ($2 > 8$)pH. Není tedy vhodné provádět tuto fytosyntézu v kyselém prostředí, neboť v kyselém prostředí dochází k malé stabilizaci stříbrných nanočástic. Naopak, k vysoké stabilizaci stříbrných nanočástic dochází v alkalickém prostředí. Bylo zjištěno, že fenoly jsou považovány za hlavní složku účastnící se fytosyntézy stříbrných nanočástic a jejich přítomnost napomáhá stabilizovat nanočástice a zlepšuje zeta potenciál koloidů [54].

2. 5. Vlastnosti nanočástic ušlechtilých kovů a jejich potenciální aplikace

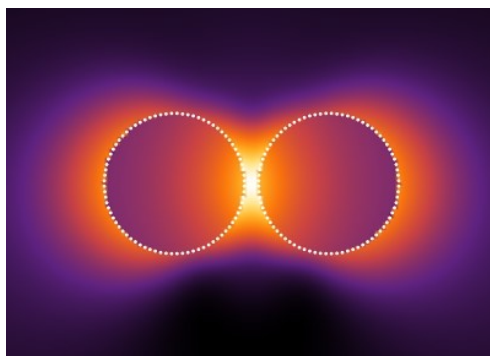
Nanočástice ušlechtilých kovů obecně vykazují zajímavé elektrické, optické, magnetické a chemické vlastnosti, které jsou silně závislé na jejich velikosti. Atraktivita těchto materiálů spočívá především v jejich aplikačním potenciálu prostupujícím všechna technologická odvětví. Klíčovými při vývoji a vylepšování vlastností v cílových aplikacích jsou velikost, tvar, složení a struktura nanočástic. Abychom dosáhli požadovaných kvalit nanočástic, můžeme různě ovlivňovat průběh jejich přípravy. Flexibilita a rozsah změn jsou pak více či méně citlivé vůči určitým parametrům.



Obr. 8: Závislost optických vlastností na velikosti a tvaru zlatých nanočástic (převzato a upraveno [55])

Optické vlastnosti zlatých nanočástic se odvíjejí od jejich tvaru a velikosti (Obr. 8). Sférické nanočástice zlata vykazují velmi intenzivní pík povrchové plazmonové rezonance, který je závislý na velikosti nanočástic (Obr. 9). V místě největšího přiblížení kovových povrchů dochází k násobnému zesílení pole dopadajícího záření. Tuto absorpci obecně

můžeme pozorovat ve viditelné oblasti spektra. Naopak v blízké infračervené oblasti vykazují silnou absorpci zlaté nanotyčinky, nanoklece a duté nanokuličky ^[56]. Uplatnění nachází nanozlato ve fototermální terapii a zobrazování biostruktur neboť krev a měkké tkáně se v infračervené oblasti jeví téměř průhledné a z toho důvodu nedochází k poškození tkání ^[57]. Bioaplikace a aplikace v medicíně jsou u ušlechtilých kovů možné díky jejich korozní odolnosti za fyziologických podmínek, biokompatibilitě a chemické inertnosti.



Obr. 9: Simulace lokalizovaného plazmonu zlatých nanočástic v těsné blízkosti ^[58]

Nanostruktury ušlechtilých kovů vykazují výjimečnou katalytickou aktivitu. Povrchové atomy mají volné vazby, což zvyšuje energii povrchu a nanočástice se pak stávají náchylnější k reakcím ^[59]. Silnou interakcí mezi adsorbovanými molekulami na povrchu kovu pak vznikají produkty. Pokud mají tyto produkty nižší vaznost na katalyzátor než reaktanty, povrch nanočástic se postupně opět nasýtí reaktanty, je regenerován, a produkt se uvolní. Například platinové nanočástice mají v porovnání s komerčními katalyzátory vyšší elektrokatalytickou aktivitu při oxidaci malých molekul či reakcích, při kterých dochází k redukci kyslíku ^[2]. Zlato naopak není v „bulk“ formě katalyticky aktivní vůbec, nicméně v nanoformě ano ^[60].

Určité typy nanoklastrů ušlechtilých kovů Au, Ag, částečně i Pt, složené z několika desítek až stovek atomů a o velikosti srovnatelné s Fermiho vlnovou délkou elektronů, mohou vykazovat vlastnosti podobné molekulám a silnou fluorescenční emisi ^[2]. Z tohoto uvedeného faktu vyplývá, že důsledná kontrola těchto stěžejních parametrů (např.: struktura nebo velikost) představuje možnost ke zvýšení aplikačního potenciálu kovových nanočástic v oblastech katalýzy, elektroniky, fotoniky, senzorové techniky a medicíny, kde poslouží jako zobrazovací a kontrastní média.

EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Cílem experimentální části bylo provést pokus fyto syntézy zlatých nanočástic s výluhem smrkového jehličí (lat. *Picea* sp.). Série pěti vzorků roztoků s obsahem zlatých nanočástic byla sledována po dobu 6 týdnů pro charakterizaci stability, byla zjištěna velikostní distribuce a míra homogenity nanočástic v roztocích. Na základě výsledků pak byla vyhodnocena opakovatelnost daného biotechnologického postupu přípravy zlatých nanočástic v koloidním roztoku.

3. Výběr biomasy pro fyto syntézu nanočástic zlata

Jak již bylo uvedeno v úvodu experimentální části, pro fyto syntézu nanozlata byl použit vodný výluh smrkového jehličí. Je třeba poznamenat, že se nejednalo o jehličí čerstvě nasbírané, ale suché, opadané, cca 2 roky staré, ze smrku určeného pro dekorální účely. Experimenty mělo být doloženo, že pro bio syntézu mají potenciál rovněž i odpadní biomasy. Toto dokládá i řada publikací, kde byly použity např.: vaječné skořápky ^[61] nebo rýžové slupky ^[62].

Rod *Picea* se řadí k nahosemenným rostlinám (*Gymnospermophytae*), oddělení *Pinophyta* (jehličnanů), třída *Pinopsida* (jehličnaté rostliny), řád *Pinales* (borovicotvaré) a čeleď *Pinaceae* (borovicovité). Jedná se o běžně se vyskytující původní jehličnatý strom na území České republiky ^[63].

Hlavními fytochemikáliemi, které mohou participovat v mechanismu bio redukce zlatitých iontů z prekursoru, jsou terpeny v pryskyřici a stilbeny (t-astringin a cis-astringin, t-piceid a cis-piceid, t-izorhapontin a cis-izorhapontin, t-piceatanol, t-resveratrol a t-isorhapontigenin). V mladých jehlicích se nachází nejvíce těchto látek, a to na jaře a na podzim ^[64].

3.1. Postup fyto syntézy nanočástic zlata

Postup přípravy výluhu byl následovný: smrkové jehličí bylo nejprve vysterilizováno na 10 minut v laminárním boxu Steril Bio-Ban Compact pro eliminaci případné mikrobiální kontaminace. 1 gram sterilního suchého smrkového jehličí byl rozmělněn v třecí misce a pak smíchán s 50 ml demineralizované vody zahřáté na 80 °C po dobu 5 minut. Výsledný výluh byl filtrován přes filtrační aparaturu s filtračním papírem Whatman (velikost pórů 11 µm) a následně přes mikrofiltr (0,2 µm) pro odstranění zbytků biomasy. Extrakt byl rozdělen na

dvě části. Pomocí pipety bylo odebráno 20 ml extraktu, který byl následně smíchán za laboratorních podmínek v poměru 1:1 s 1 mM roztokem HAuCl_4 (prekurzor s pH 2,82). Zbývající část výluhu sloužila jako kontrolní vzorek. Takto bylo připraveno celkem 5 vzorků roztoků se zlatými nanočásticemi (Au1-Au5) a 5 kontrolních vzorků výluhů (K1-K5).

3.2. Použité metody charakterizace fyto-syntetizovaných zlatých nanočástic

Zobrazovací a analytické metody byly vybrány pro charakterizaci stability, homogenity a velikostní distribuce zlatých nanočástic v roztocích. Výsledné hodnoty jsou pak dále diskutovány v kapitole 4. Snímky vzniklých nanočástic zlata byly pořízeny transmisním elektronovým mikroskopem JEOL 1011 při urychlovacím napětí 80 kV v laboratoři elektronové mikroskopie Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy v Praze. Příprava vzorků pro měření probíhala následovně: na mřížku byly nakápnuty 2 μl roztoku s obsahem zlatých nanočástic, který se nechal 5 minut sušit. Přebytečný roztok byl odsát. Distribuční křivky a průměrná hodnota velikosti nanočástic byla získána pomocí programu JMicroVision 1.2.7. Pro velikostní distribuci nanočástic bylo vždy z reprezentativního TEM snímku bráno pro výpočet více než 350 nanočástic. Pro naměření spekter absorpance ve vzorcích byl použit UV-VIS spektrometr LAMBDA 11 (výrobce PerkinElmer) na pracovišti Centra nanotechnologií VŠB-TUO.

Pro měření zeta potenciálu, což je náboj na povrchu nanočástic v koloidním roztoku, byl použit analyzátor Horiba LA950 na pracovišti Centra nanotechnologií VŠB-TUO.

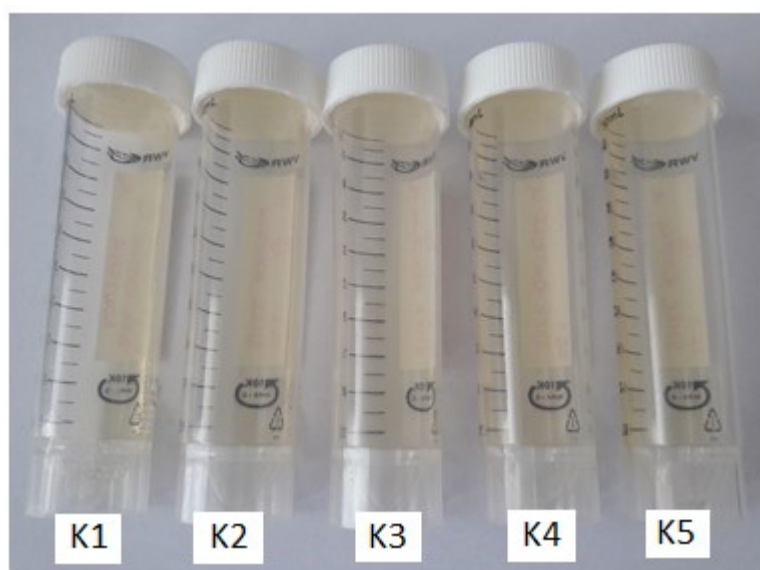
Pomocí pH metru EUTECH Ph 5+ s teplotní sondou a po kalibraci roztokem (Hamilton Duracal Butter pH $7,00 \pm 0,01$) byly měřeny pH jak kontrolních výluhů, tak i roztoků s nanozlatem.

4. Výsledky a diskuse

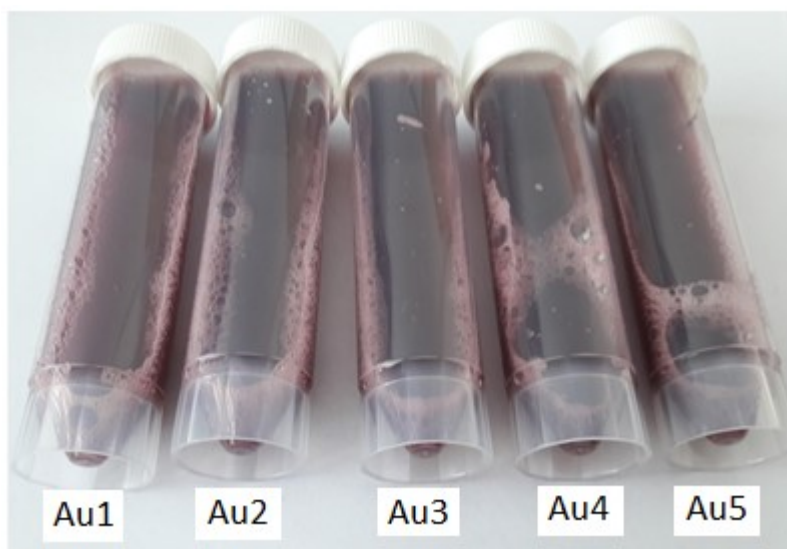
Byly provedeny experimenty využívající obsahové látky smrkového jehličí (lat. *Picea* sp.) k fyto-syntéze (redukci i stabilizaci) nanočástic zlata z vodného 1mM roztoku prekurzoru HAuCl_4 . Tato metoda redukce zlatitých iontů na zlaté nanočástice se ukázala jako efektivní a levná technika jejich přípravy. Její provedení je relativně jednoduché a probíhá i za normálních laboratorních podmínek. Tuto metodu lze v porovnání s klasickými

chemickými metodami příprav považovat za metodu zelené chemie, neboť prakticky jedinou potřebnou chemikálií v tomto postupu je zmiňovaný prekursor zlatitých kationtů.

Po smíchání prekursoru a výluhu z jehličí za normálních podmínek (teplota 23 °C, přirozené osvětlení) se roztok zbarvil do červeno-fialové barvy. Barevná změna, indikující fytyntézu zlatých nanočástic, proběhla u všech vzorků do cca 1 minuty. K této barevné změně dochází na základě dynamického rozptylu světla na jednotlivých nanočásticích zlata. Na obrázku 10 jsou zdokumentovány původní výluhy a na Obr. 11 roztoky Au1 až Au5 s nanočásticemi zlata, které vznikly smícháním výluhů K1 až K5 s prekurzorem HAuCl_4 .



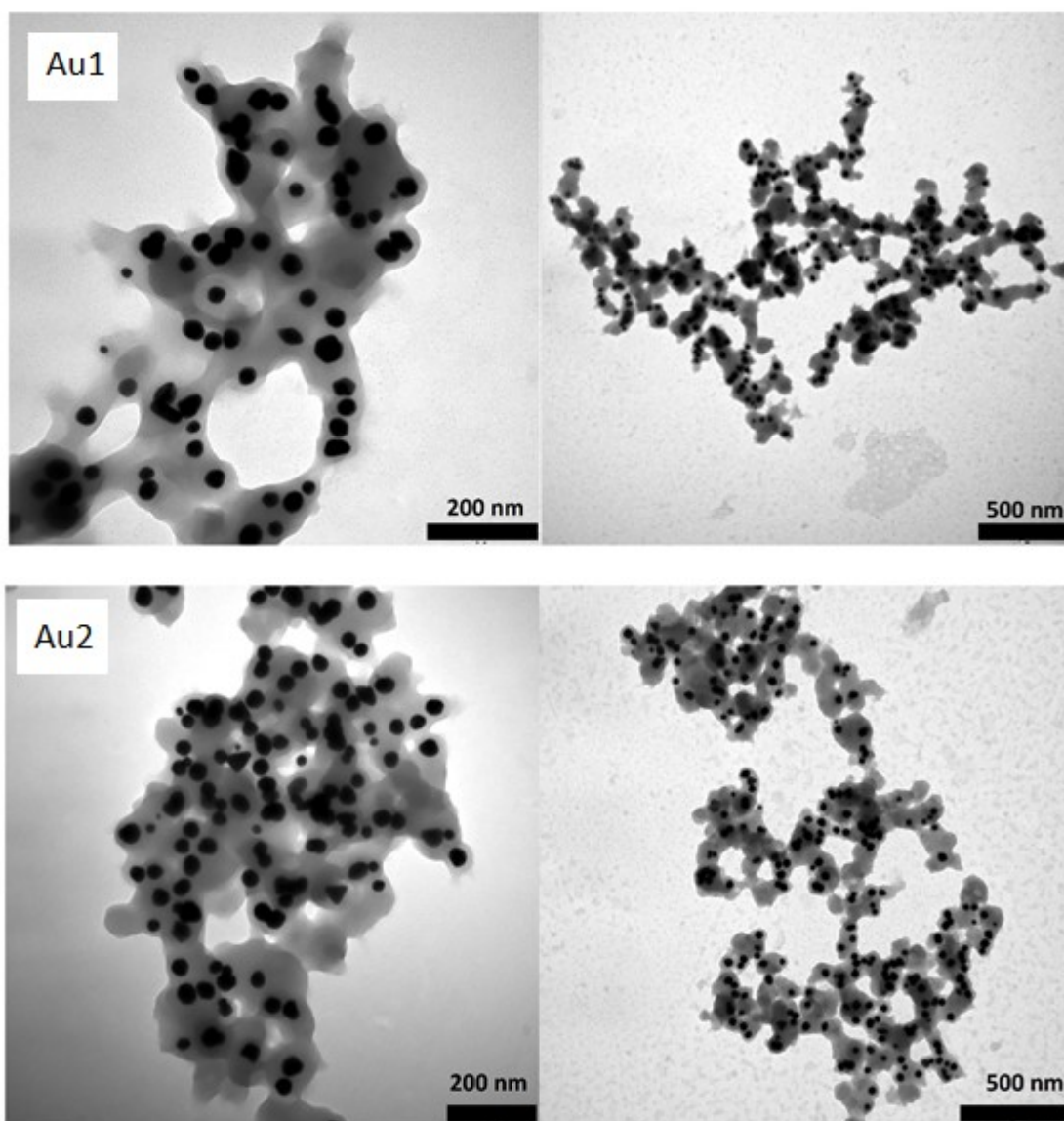
Obr. 10: Výluhy ze smrkového jehličí (vzorky K1 – K5)

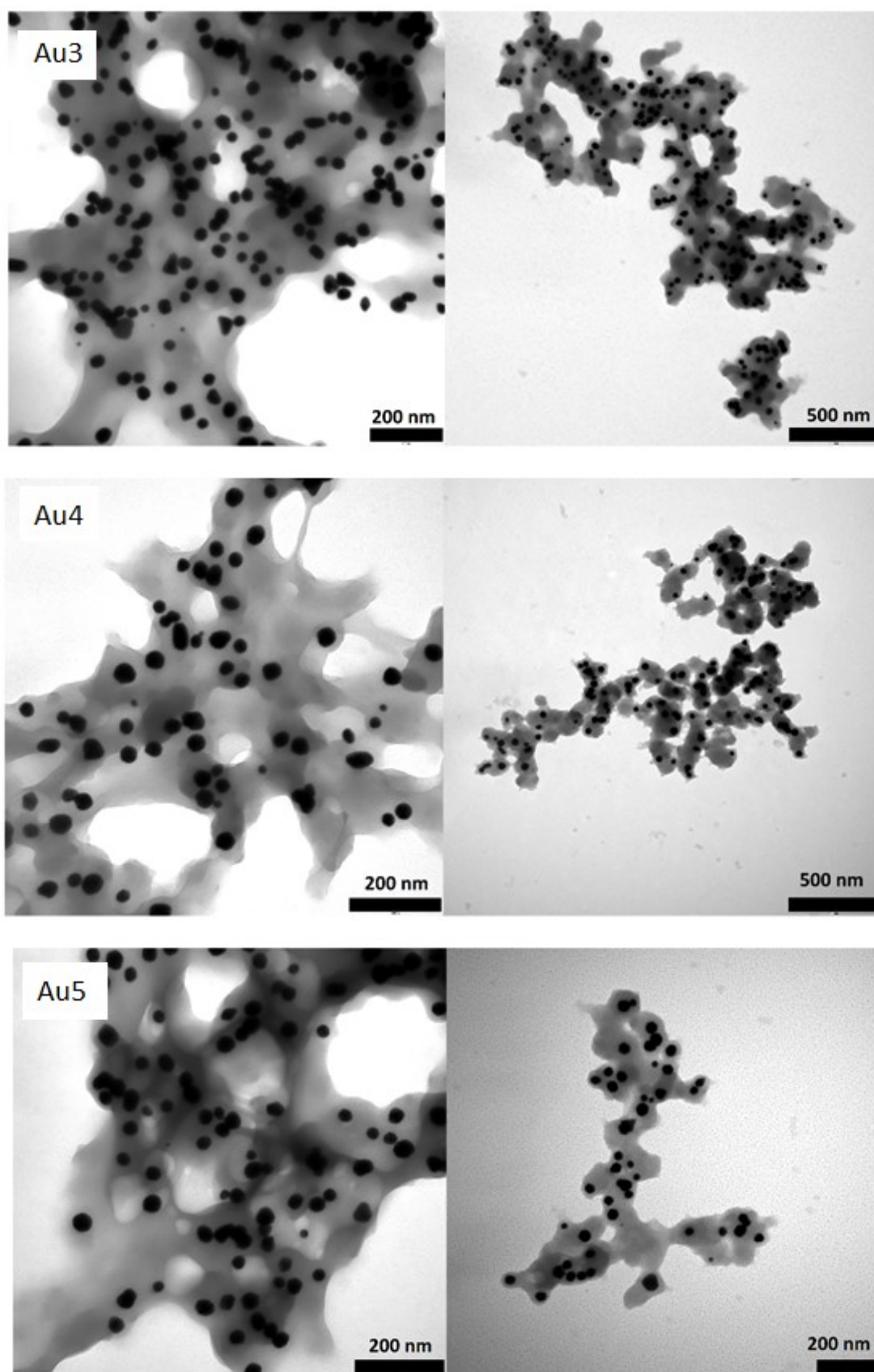


Obr. 11: Roztoky s nanočásticemi zlata (vzorky Au1 – Au5)

4.1. Vyhodnocení velikostní distribuce biosyntetizovaných zlatých nanočástic

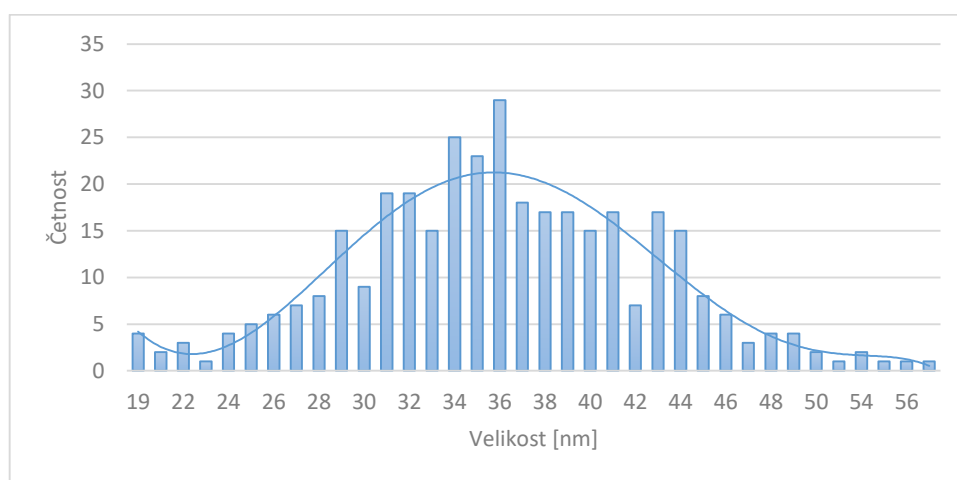
S ohledem na dostupnost metody i časovou náročnost měření i samotného zpracování velikostní distribuce nanočástic byly analýzy na TEM realizovány ve dvou termínech, a to po 16 dnech (vzorky dále označeny Au1 až Au5) a 32 dnech od realizace experimentu syntézy nanočástic. Analýzou na TEM byla potvrzena přítomnost zlatých nanočástic ve všech koloidních roztocích (Obr. 12, vlevo měření po 16 dnech, vpravo po 32 dnech). Ve všech koloidních roztocích se vyskytovaly převážně sférické zlaté nanočástice, ale některé měly i trojúhelníkový nebo pětiúhelníkový tvar. Na snímcích lze vidět také obal z fytochemikálií, které stabilizují nanočástice a chrání je před agregací.



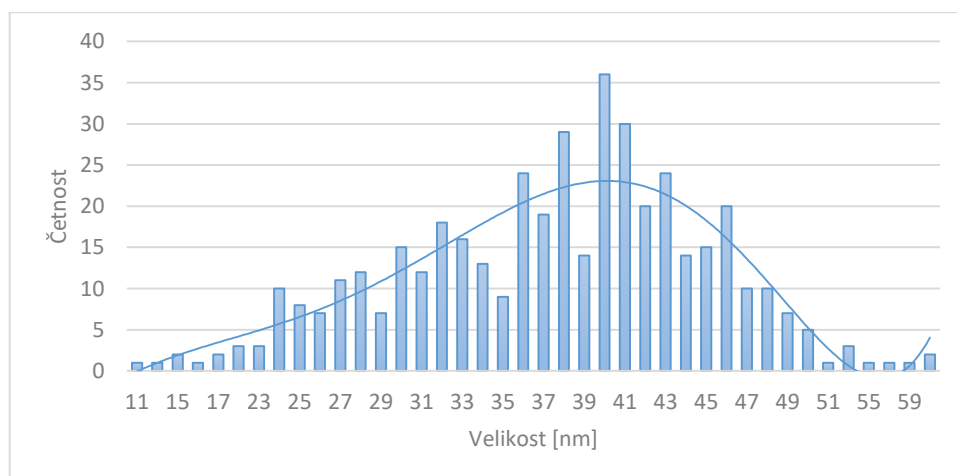


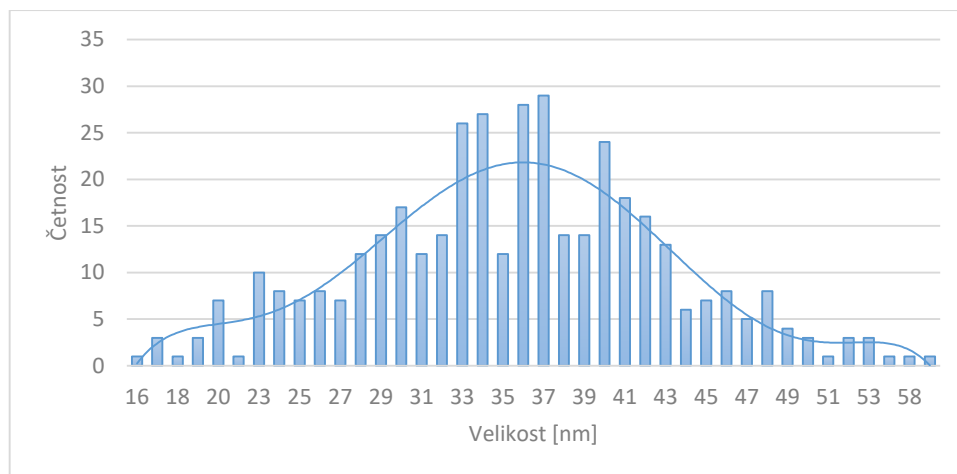
Obr. 12: TEM snímky fyto-syntetizovaných zlatých nanočástic vlevo pro první měření (po 16 dnech), vpravo pro měření druhé (po 32 dnech)

Distribuce velikosti nanočástic každého vzorku byla stanovována z nejméně 350 nanočástic a pro každý vzorek byl sestaven histogram (Graf. 1-5). Průměrná velikost nanočástic zlata pro Au1 byla 37 nm. Nejmenší analyzovaná nanočástice měla 19 nm a největší analyzovaná nanočástice 65 nm. V Au2 byla průměrná velikost zlatých nanočástic 38 nm s rozptylem od 11 nm do 60 nm. Dále pak ve Au3 byly analyzované částice od 16 nm do 62 nm s průměrnou velikostí 36 nm. Průměrná velikost nanočástic zlata ve Au4 byla 38 nm s nejmenší analyzovanou částicí o velikosti 15 nm a největší 63 nm. V Au5 byla průměrná velikost nanočástic zlata stanovena na 37 nm s nejmenší analyzovanou částicí 16 nm a největší 63 nm.

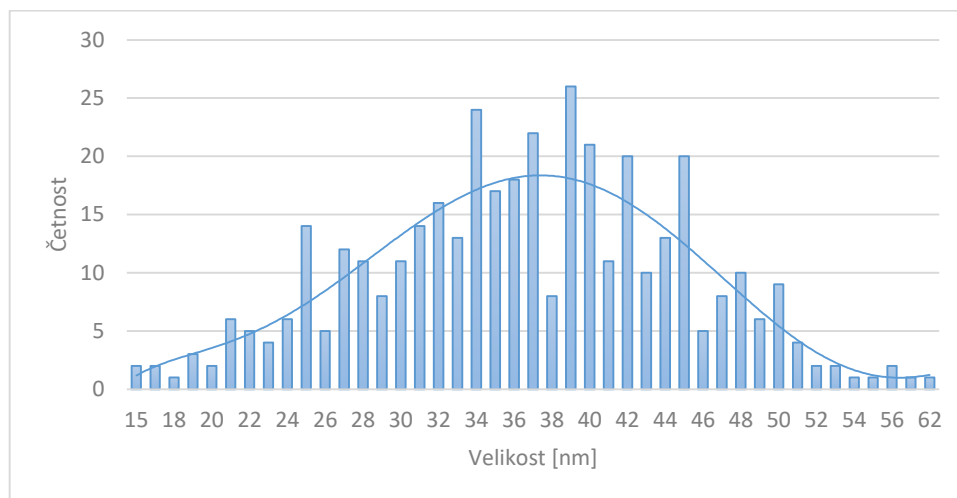


Graf 1: Distribuce velikosti zlatých nanočástic v Au1 po 16 dnech

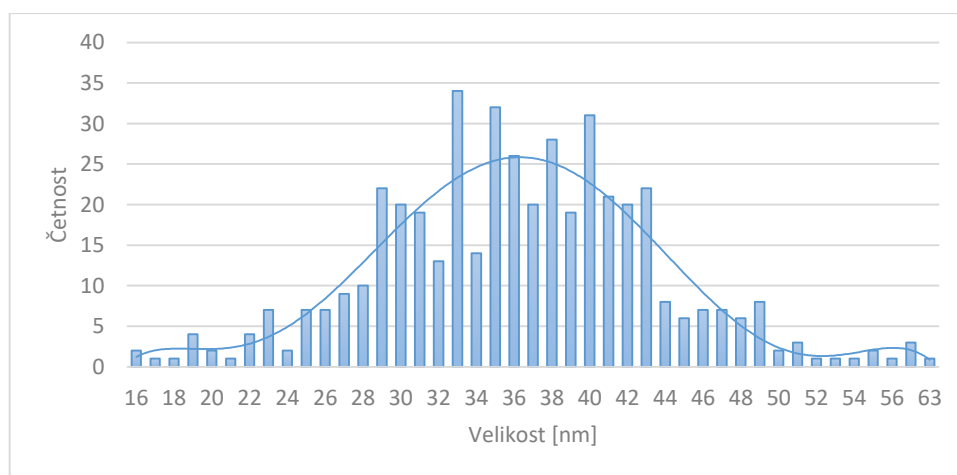




Graf 3: Distribuce velikosti zlatých nanočástic v Au3 po 16 dnech



Graf 4: Distribuce velikosti zlatých nanočástic v Au4 po 16 dnech

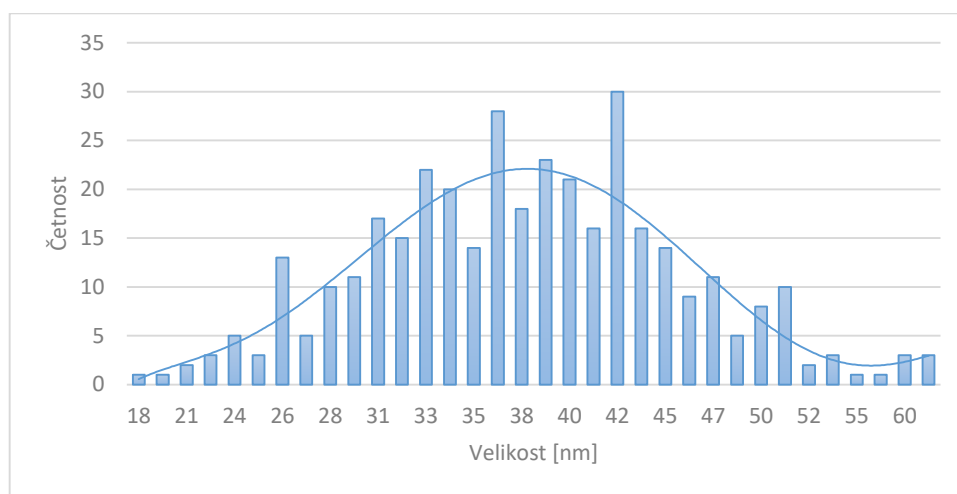


Graf 5: Distribuce velikosti zlatých nanočástic v Au5 po 16 dnech

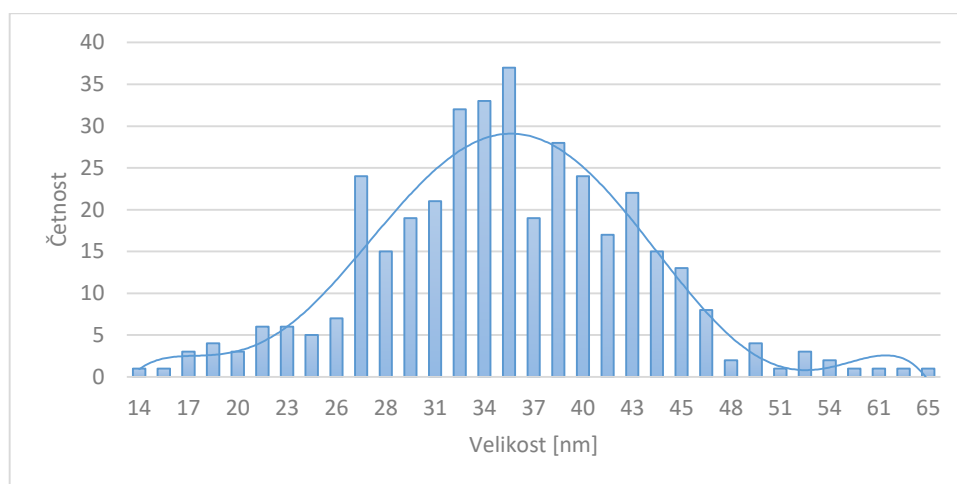
Pro druhé stanovení distribuce velikosti nanočástic zlata pomocí TEM byly rovněž sestaveny histogramy (Graf 6-10). V Au1 se průměrná velikost zvýšila na 38 nm, kdy nejmenší analyzovaná částice měřila 18 nm a největší 61 nm. Pro Au2 došlo k mírnému

poklesu průměrné velikosti nanočástic zlata na 35 nm a s nejmenší hodnotou 14 nm a největší 65 nm. Zlaté nanočástice v Au3 měli průměrnou velikost 38 nm, kde nejmenší analyzovaná nanočástice měla 18 nm a největší 60 nm. Stanovená průměrná velikost zlatých nanočástic v Au4 se mírně snížila a byla 37 nm, analyzovaná částice s nejmenší velikostí měla 15 nm a s největší 65 nm. Hodnoty v Au5 se oproti prvnímu měření mírně snížily na průměrnou velikost zlatých nanočástic 36 nm, kde nejmenší analyzovaná částice měřila 17 nm a největší měřila 64 nm.

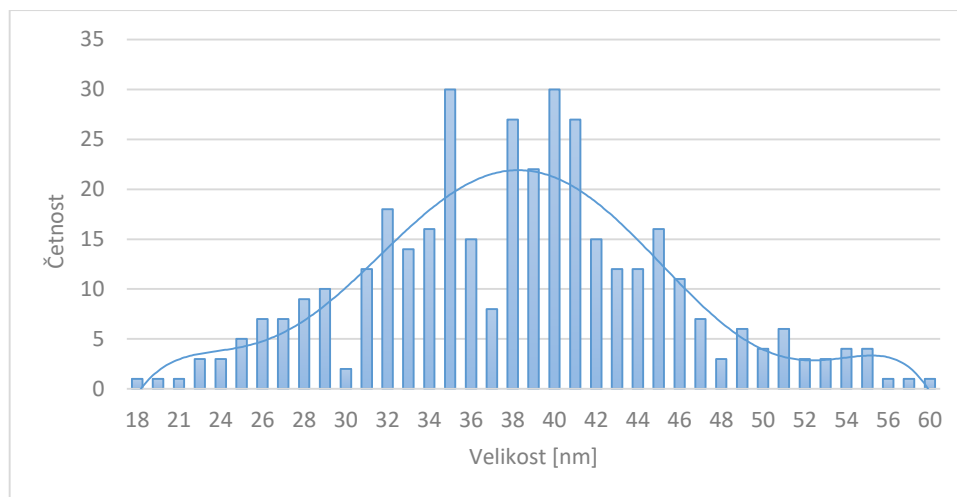
Pro lepší porovnání průměrných velikostí byly hodnoty zaznamenány do tabulky (Tab. 3).



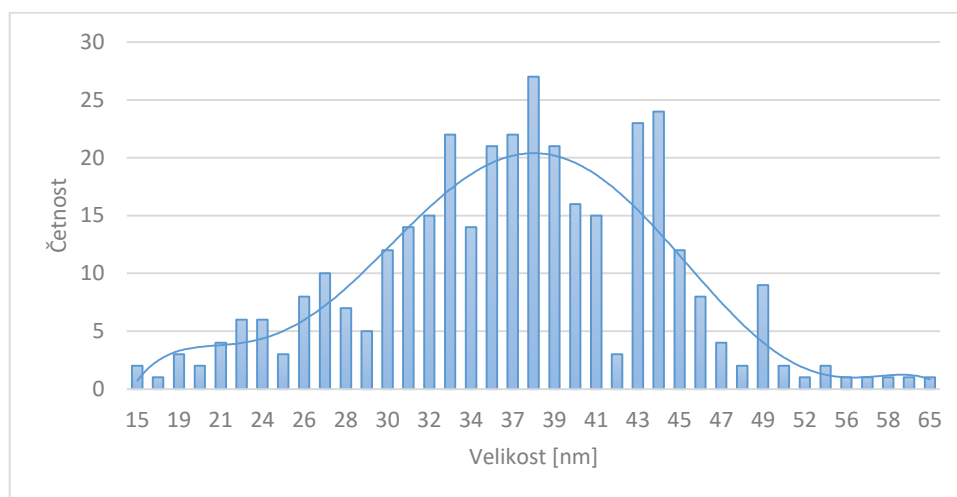
Graf 6: Distribuce velikosti zlatých nanočástic v Au1 po 32 dnech



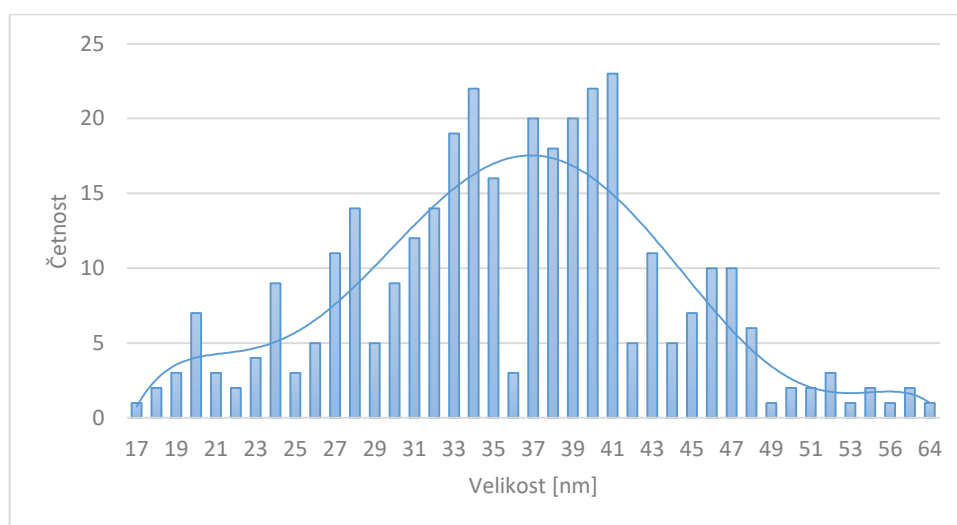
Graf 7: Distribuce velikosti zlatých nanočástic v Au2 po 32 dnech



Graf 8: Distribuce velikosti zlatých nanočástic v Au3 po 32 dnech



Graf 9: Distribuce velikosti zlatých nanočástic v Au4 po 32 dnech



Graf 10: Distribuce velikosti zlatých nanočástic v Au5 po 32 dnech

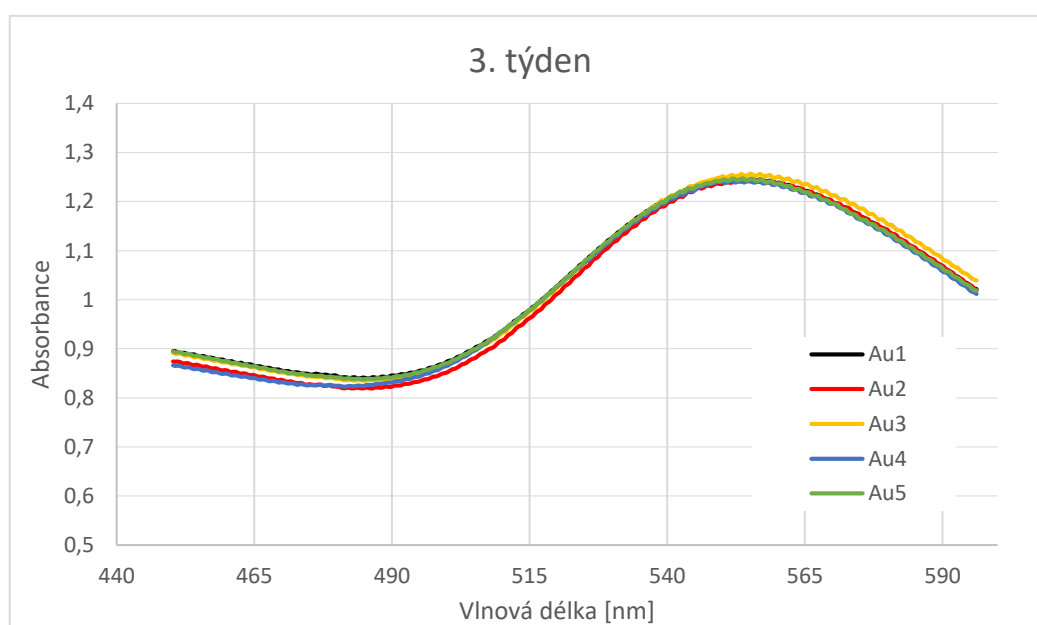
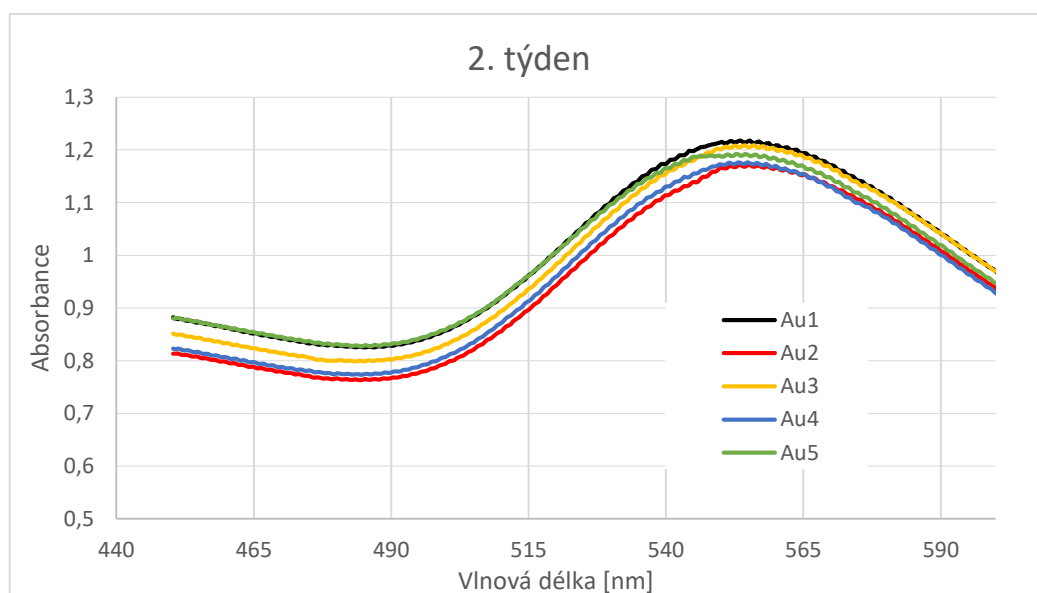
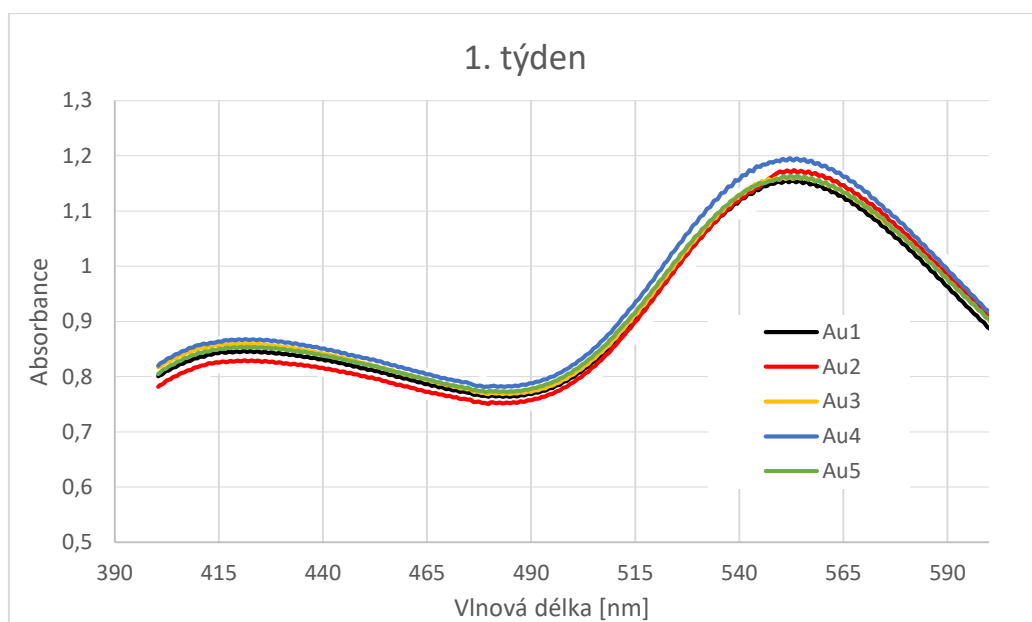
Tab. 3: Průměrná velikost fytosyntetizovaných nanočástic zlata

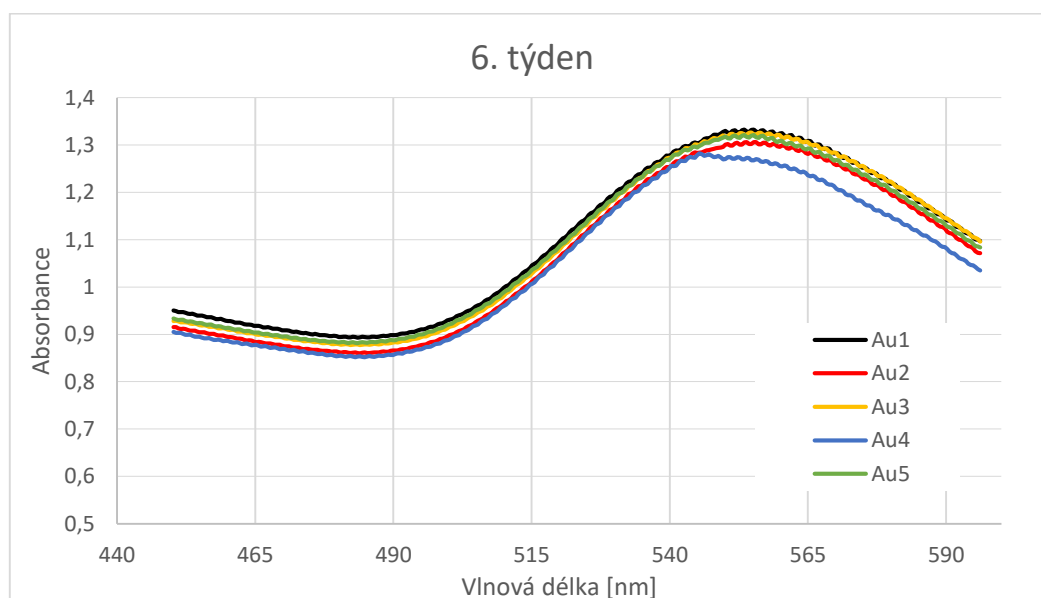
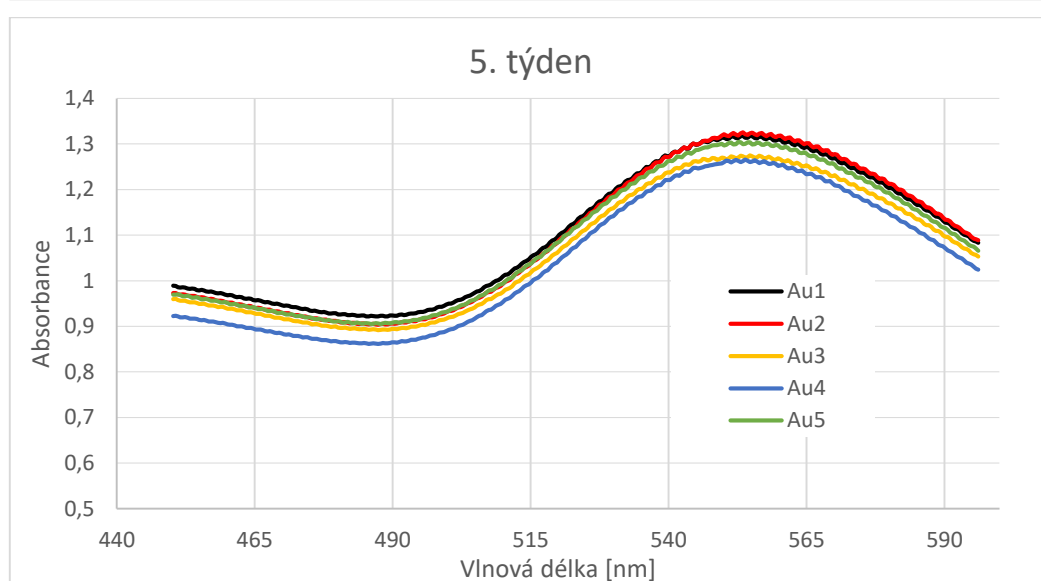
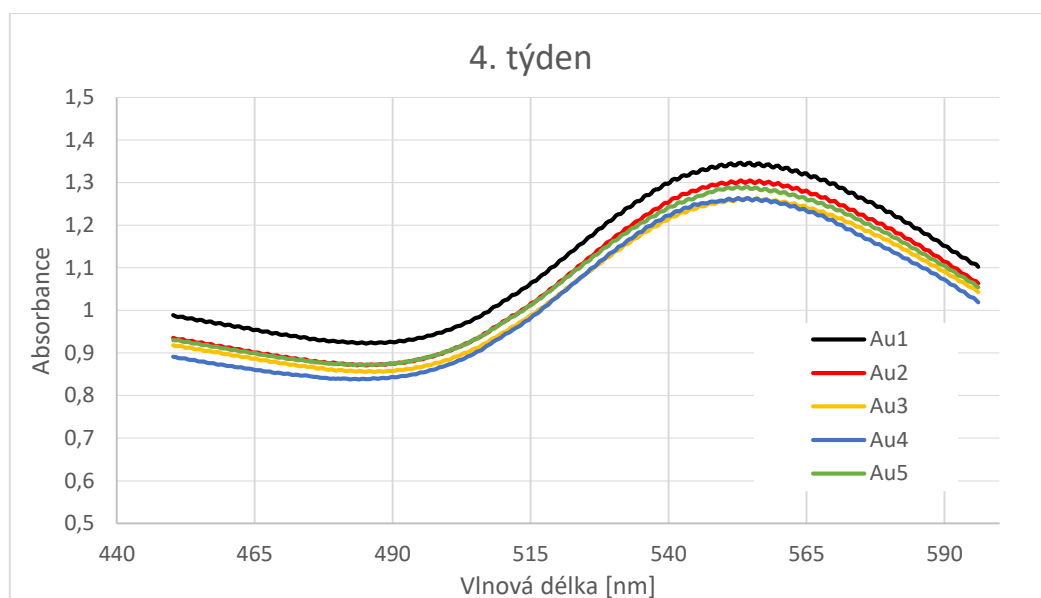
	1. měření po 16 dnech	2. měření po 32 dnech
	průměrná velikost [nm]	
Au1	36,5	38,0
Au2	37,9	35,4
Au3	35,9	38,4
Au4	37,8	36,8
Au5	36,6	36,2

Po zprůměrování hodnot z prvního měření plyne, že průměrná velikost nanočástic je 36,9 nm a pro druhé měření 37,0 nm. Z porovnání hodnot plyne, že ve všech vzorcích je průměrná velikost částic více méně stabilní, nicméně rozptyl hodnot je velký, takže nelze příliš hovořit o velikostně homogenní soustavě. Pro snížení heterogenity, co se velikosti i tvarů nanočástic týká, by bylo v budoucnu nutné provést během biosyntézy určité optimalizační kroky.

4.2. UV – VIS spektrometrie

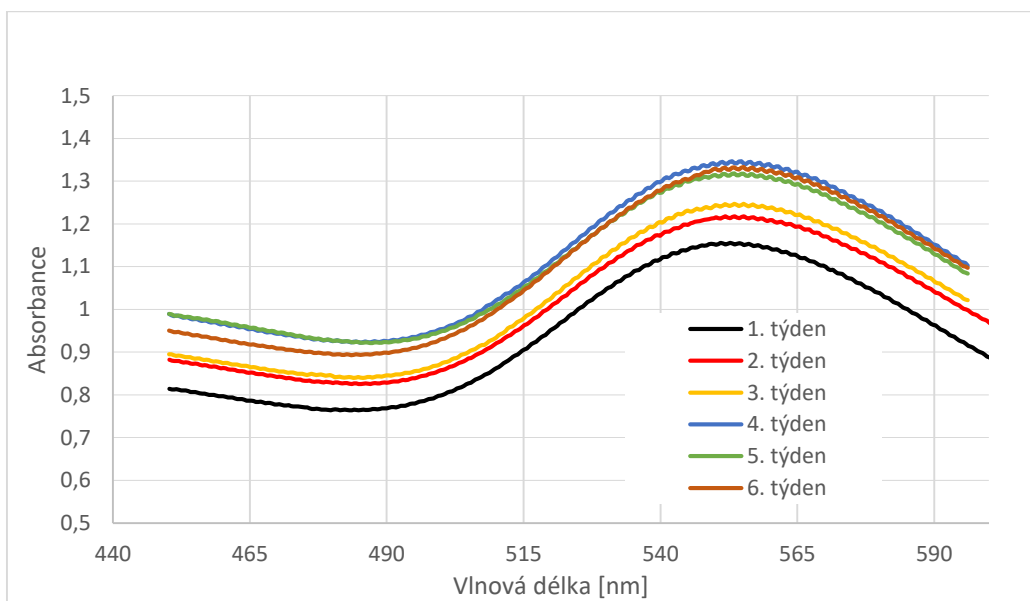
U nanočástic zlata docházelo k absorpci v rozmezí 551 - 559 nm vlnové délky po celou dobu měření. V průběhu 6. týdnů se absorpční křivky všech vzorků shodovaly až na malé odchylky (obr. 13). Absorpční křivka se pro 4. vzorek v 6. týdnu odchýlila a neshodovala se s ostatními. Tato odchylka je pravděpodobně způsobena tím, že ve vzorku se vyskytovaly menší nanočástice. V souladu s předchozími analýzami pomocí TEM lze konstatovat, že byly připraveny charakterově velmi podobné koloidní roztoky s obsahem zlatých nanočástic, a že tedy dané pilotní testy fytosyntézy byly opakovatelné.



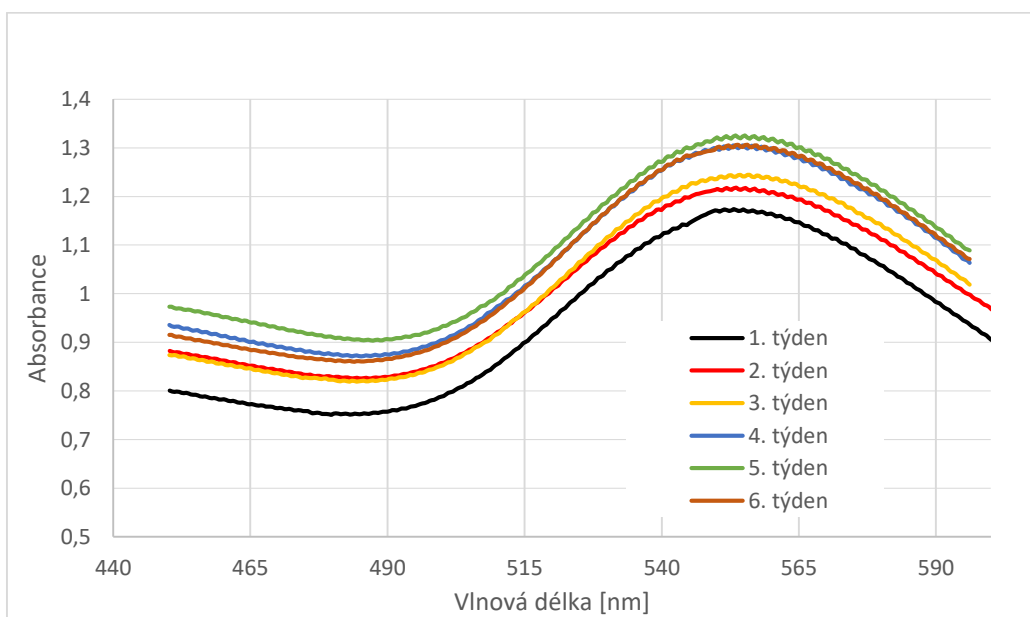


Obr 13: UV-VIS absorpční spektra vzorků Au1 – Au5 pro zlaté nanočástice v průběhu 6. týdnů

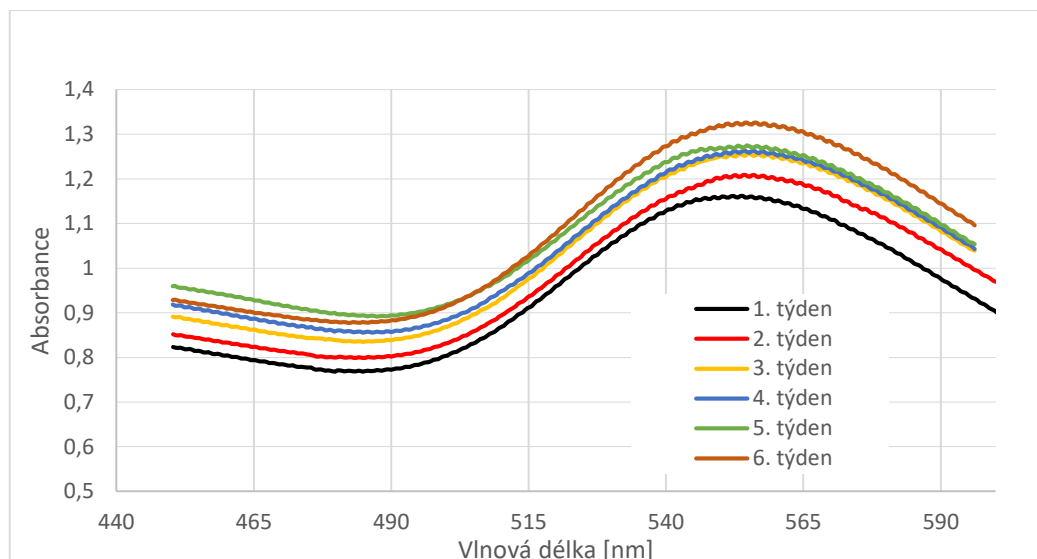
Jak je vidět na porovnání všech záznamů pro každý jednotlivý vzorek (Graf 11 – 15), hodnota absorpce stoupal. Růst výšky absorpce píku byl způsoben tím, že do 4. týdne dochází stále k tvorbě zlatých nanočástic. Je to dáno tím, že ve vzorcích stále probíhají redukční reakce a vedou ke vzniku dalších částic. Také jde vidět, že syntéza částic v čase klesá až do 4. týdnu. Po 4. týdnu jde vidět relativní ustálení maximální absorpce. Avšak nedocházelo k posunutí hodnoty vlnové délky při maximální absorpci. To znamená, že většina nanočástice zlata vznikla najednou a dále už se pouze mírně zvětšovala jejich velikost.



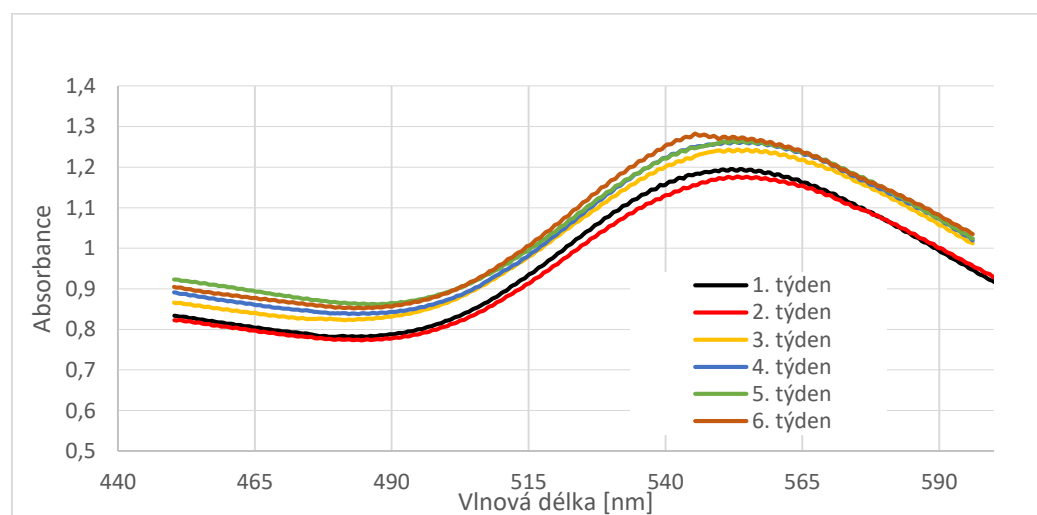
Graf 11: Vývoj závislosti absorpance na vlnové délce pro Au1



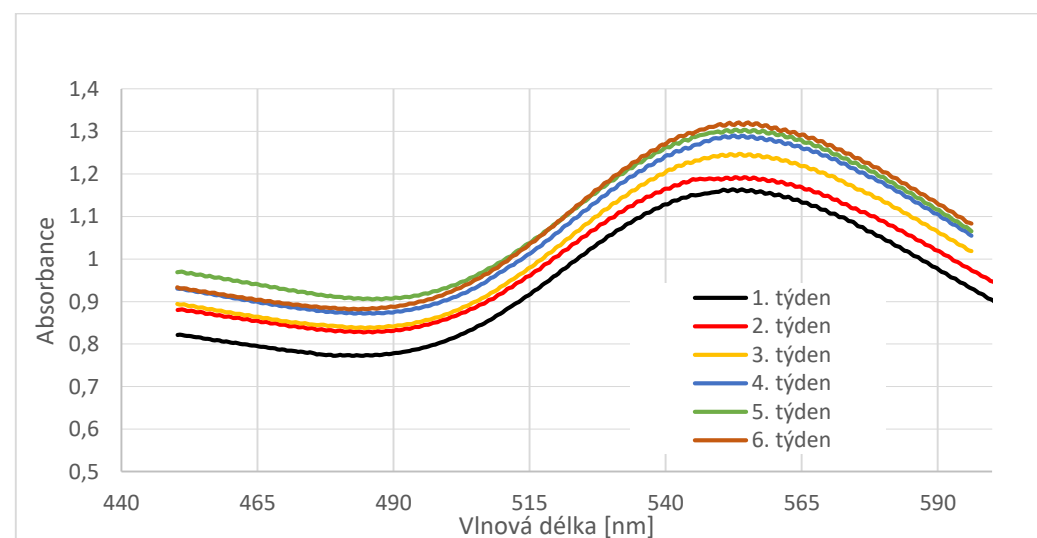
Graf 12: Vývoj závislosti absorpance na vlnové délce pro Au2



Graf 13: Vývoj závislosti absorpance na vlnové délce pro Au3



Graf 14: Vývoj závislosti absorpance na vlnové délce pro Au4



Graf 15: Vývoj závislosti absorpance na vlnové délce pro Au5

4.3. pH a zeta potenciál

Na základě měření bylo zjištěno pH jak výluhů, tak i vzorků. Hodnoty pH výluhů v 1. den měření se pohybovaly okolo $4,02 \pm 0,01$. Po smíchání výluhu s 1 mM roztokem HAuCl_4 o hodnotě pH 2,82 bylo naměřeno pH vzorků, které se pohybovalo okolo hodnoty $3,13 \pm 0,01$. Dá se říct, že pH $4,02 \pm 0,01$ pro čistý výluh a $3,13 \pm 0,01$ pro vzorky se drželo po celou dobu sledování. Každé měření bylo zapsáno a hodnoty jsou uvedeny v tabulce 4.

Tab. 4: Naměřené hodnoty pH u výluhů a vzorků

	1. týden	2. týden	3. týden	4. týden	5. týden	6. týden
K1	3,99	3,97	3,98	4,03	4,03	4,00
K2	4,03	4,04	4,03	4,01	4,02	4,03
K3	4,04	4,02	4,00	4,02	4,00	4,02
K4	4,02	3,99	3,99	4,00	4,00	4,00
K5	4,00	4,00	4,00	4,02	4,01	4,01
Au1	3,13	3,11	3,14	3,12	3,1	3,12
Au2	3,15	3,12	3,14	3,14	3,12	3,11
Au3	3,16	3,12	3,12	3,12	3,11	3,10
Au4	3,08	3,10	3,08	3,10	3,08	3,10
Au5	3,11	3,11	3,10	3,12	3,09	3,11

Charakterizace zeta potenciálem a naměřené výsledky poukazují na zvětšující se stabilizační obal okolo zlatých nanočástic (Tab. 5). Tímto procesem se zlaté nanočástice stávají stabilnějšími. Koloidní stabilita roztoků se dle stupně velikosti zeta potenciálů dělí na vysoce nestabilní (0 ± 10 mV), relativně stabilní ($\pm 10 - 20$ mV), mírně stabilní ($\pm 20 - 30$ mV) a vysoce stabilní ($>\pm 30$ mV) ^[65]. Podle tohoto rozdělení byly zlaté nanočástice relativně stabilní, protože všechny hodnoty naměřeného zeta potenciálu se pohybovaly v daném rozmezí hodnot.

Tab. 5: Naměřené hodnoty zeta potenciálu

	Zeta potenciál [mV]					
	1. týden	2. týden	3. týden	4. týden	5. týden	6. týden
Au1	-15,10	-16,50	-19,00	-17,90	-19,40	-18,60
Au2	-16,30	-17,00	-17,00	-18,00	-18,30	-18,40
Au3	-15,70	-17,10	-17,60	-18,50	-18,30	-19,00
Au 4	-16,00	-16,70	-17,80	-18,50	-17,80	-19,00
Au 5	-15,60	-16,90	-17,70	-17,40	-18,60	-18,40
Průměr	-15,74	-16,84	-17,82	-18,06	-18,48	-18,68

Z měření pomocí UV-VIS spektrometru bylo zjištěno, že v době okolo 4. týdne se začínají částice stabilizovat a již dále neroste jejich množství. To potvrzuje i měření zeta potenciálu. Na základě počátečních hodnot měření jsou zlaté nanočástice nestabilní. V průběhu měření se částice stabilizují až do 4. týdnu, kde dochází ke zpomalení nárůstu hodnot. Z hodnot se dá usoudit, že tento proces není příliš rychlý a tím pádem se vzniklé nanočástice zlata dají považovat za relativně stabilní. V rámci celého měření se pH vzorků ani výluhů nijak výrazně nelišilo.

Měřením byla potvrzena opakovatelnost na základě porovnání hodnot jednotlivých vzorků mezi sebou. Fytosyntetizované zlaté nanočástice byly relativně stabilní ve všech vzorcích, což vyplynulo z měření zeta potenciálu, UV – VIS spektroskopie i transmisí elektronové mikroskopie. Na základě UV – VIS spektroskopie a transmisí elektronové mikroskopie také můžeme říct, že nanočástice zlata v koloidu byly heterogenní.

Opakovatelnost přípravy nanočástic se obecně odvíjí od biomasy, která je použita v experimentu biosyntézy. Jak již bylo zmíněno v teoretické části, práce s biologickým materiálem může být problematická z pohledu opakovatelnosti, reprodukovatelnosti a zajištění vždy stejných podmínek. Díky fytochemikáliím obsaženým v jednotlivých rostlinách mohou být výsledky rozdílné. Tato práce ukázala, že je možné opakovat fytosyntézu zlatých částic s využitím smrkového jehličí jakožto odpadní biomasy a je možné připravit charakterově velmi podobné koloidní roztoky s obsahem zlatých nanočástic. Práce popisuje pilotní (vstupní) experimenty a pro dosažení lepších parametrů nanočástic bude v budoucnu nutné postup biosyntézy optimalizovat a modifikovat. Změnou reakčních podmínek, např. sledováním vlivu pH, teploty, míchání, ale i výběrem biomasy a její úpravou lze připravit zlaté nanočástice s lepší homogenitou i menších rozměrů. Pro optimalizaci postupu biosyntézy bude dále rovněž důležité lépe porozumět mechanismu biosyntézy a charakterizovat detailněji obsahové látky ve výluhu.

5. Závěr

Tato práce byla vypracována za účelem studia opakovatelnosti postupu biosyntézy zlatých nanočástic s využitím odpadní biomasy – smrkového jehličí (lat. *Picea* sp.).

Teoretická část zařazuje biosyntézu jako jednu z možných metod přípravy nanočástic kovů. Dále se pak postupně zabývá fyto-syntézou nanočástic kovů, jejím principem, mechanismem, vlastnostmi a možnými aplikacemi biosyntetizovaných kovových nanočástic, výhodami a nevýhodami biosyntéz, reakčními podmínkami, principy stabilizace nanočástic a metodami užitými v této práci pro charakterizaci vzniklých nanočástic.

Paralelně bylo připraveno 5 vzorků koloidních roztoků s obsahem zlatých nanočástic, které byly sledovány 6 týdnů. Zlaté nanočástice byly charakterizovány z pohledu jejich stability, velikosti a homogenity dostupnými analytickými a zobrazovacími metodami - transmisí elektronovou mikroskopií, UV – VIS spektroskopií, měřením pH a zeta potenciálu. Prvním indikátorem fyto-syntézy zlatých nanočástic ve vzorcích bylo výrazné zbarvení do sytě červeno-fialové barvy, které u všech vzorků proběhlo do 1 minuty. Pro ověření opakovatelnosti byla použita UV-VIS spektroskopie, z jejichž naměřených dat byly sestaveny jednotlivé grafy absorpčních křivek. Tyto křivky byly téměř totožné pro všech 5 vzorků po celou dobu sledování. Absorpční křivky byly následně porovnávány v rámci 6. týdnů pro každý vzorek zvlášť. Zajímavé bylo, že maximální hodnota absorbance zůstávala stejná (cca 555 nm), tedy velikostní distribuce nanočástic se nijak výrazně neměnila, ale absorbance rostla až do 4. týdne měření. Z toho lze usoudit, že stále docházelo k formaci nových nanočástic zlata.

Obrazovou analýzou více než 350 nanočástic zlata pro jednotlivé vzorky bylo zjištěno, že průměrná velikost nanočástic v Au1 – Au5 po 16 dnech byla cca 36 až 38 nm a ani po 32 dnech se v podstatě nezměnila.. TEM umožnil i prozkoumat morfologii vzniklých nanočástic. Na pozorovaných snímcích byly vidět ve velkém množství sférické nanočástice a v menší míře i trojúhelníkové nebo pětiúhelníkové.

Charakterizace stability nanočástic zlata pomocí měření zeta potenciálu vedla k závěru, že jsou částečně relativně stabilní. Pro lepší odhad stability by bylo dobré sledovat koloidní roztoky v ještě delším časovém intervalu. Nicméně v průběhu 6. týdnů nebyly v roztocích pozorovány shluky částic, které by agregovaly. Pouze se ve všech roztocích objevovaly částice sedimentující na dno zkumavky, které po roztřepání zmizely. Hodnoty čeho byly záporné a stále se nepatrně snižovaly, což znamená nárůst stabilizačního obalu. V průběhu 4. – 6. týdne došlo k naměření téměř stejných hodnot, tj. – 18,06 až - 18,68.

Paralelně s měřením zeta potenciálu bylo měřeno i pH extraktů a vzorků. To však zůstávalo až na malé odchylky stejné po celou dobu sledování.

Shrnutím celé této bakalářské práce je, že nanočástice zlata fytosyntetizované touto metodou jsou relativně stabilní, s širší velikostní distribucí a s průměrnou velikostí nanočástic 37 nm převážně sférického tvaru. Tato metoda přípravy za uvedených podmínek byla opakovatelná, nicméně změnou reakčních podmínek lze v budoucnu charakter připravených nanočástic dále optimalizovat.

6. Literatura:

- [1] ČECH BARABASZOVÁ, Karla. *Nanotechnologie a nanomateriály*. Ostrava: Tiskárna Schenk, 2006. ISBN 80-248-1210-X.
- [2] SIEGEL, Jakub, Marek STASZEK a Václav ŠVORČÍK. *Nanočástice ušlechtilých kovů připravené v kapalinách*. Chem. Listy 108. 2014, 1102–1112.
- [3] ŽŮREK, Michal, Pavel KOPEL, David HYNEK, Vojtěch ADAM a René KIZEK. *Zelená syntéza stříbrných a zlatých nanočástic pomocí extraktů z vyšších rostlin*. Journal of Metallomics and Nanotechnologies 2014, 1, 47—49.
- [4] PRNKA, Tasilo a Karel ŠPERLINK. *Sedmý rámcový program evropského výzkumu a technického rozvoje*. 2006. DOI: 80-7329-134-7 (brož.). ISBN 80-732-9134-7.
- [5] DURÁN, Nelson, Priscyla D MARCATO, Oswaldo L ALVES, Gabriel IH DE SOUZA a Elisa ESPOSITO. *Mechanistic aspects of biosynthesis of silver nanoparticles by several Fusarium oxysporum strains*. Journal of Nanobiotechnology. 2005. DOI: 10.1186/1477-3155-3-8. ISBN 10.1186/1477-3155-3-8. Dostupné také z: <http://jnanobiotechnology.biomedcentral.com/articles/10.1186/1477-3155-3-8>
- [6] NOVOTNÁ, Kateřina, *Řízená příprava nanočástic stříbra v přítomnosti polyakrylátů s různou molekulovou hmotností*. Olomouc, 2010, 80. Magisterská práce, Univerzita Palackého v Olomouci, vedoucí práce RNDr. Aleš PANÁČEK, PH.D.
- [7] FILIPOVÁ, Zuzana, G. KRATOŠOVÁ, A. SCHRÖFEL a M. MAŠLÁN. *Biosyntéza nanomateriálů*. Olomouc, 2012. 978-80-244-3202-1.
- [8] SÁDECKÁ, Jana, Ján LABUDA a Veronika URÍČKOVÁ. *Potenciální aplikace v léčbě rakoviny, v elektronice, v biosenzorech pro detekci virů a bakterií, dodávání léků, zobrazování nádorů, fototerapii*. Chem. Listy 106. 2012, 739 -744.
- [9] ATKINSON, Bernard a Ferda MAVITUNA. *Biochemical engineering and biotechnology handbook*. 2nd ed. Houndmills, Basingstoke, Hampshire: Macmillan, 1991. ISBN 9781561590124.

- [10] IRAVANI, S. (2011). *Green synthesis of metal nanoparticles using plants*. *Green Chemistry* 13(10): 2638-2650.
- [11] RAI, M. Posten, *Green Biosynthesis of Nanoparticles – Mechanisms and Applications*. C. (eds), CABI Publishing 2013, 248 s.
- [12] GUO, Mingxia, Wei LI, Feng YANG a Huihong LIU. *Controllable biosynthesis of gold nanoparticles from a Eucommia ulmoides bark aqueous extract*. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 142. 2015, 73-79. DOI: 10.1016/J.SAA.2015.01.109. ISBN 10.1016/j.saa.2015.01.109. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1386142515001304>
- [13] STEPHEN Mann, *Biom mineralization, Principles and Concepts in Bioinorganic Materials Chemistry*, Oxford University Press Inc., New York, 2001.
- [14] NARAYANAN K., Sakthivel N. *Biological Synthesis of Metal Nanoparticles by Microbes*. *Advances in Colloid and Interface Science* 156 (1-2): 1–13, 2010
- [15] MUKHERJEE, Priyabrata, Absar AHMAD, Deendayal MANDAL, et al. *Fungus-Mediated Synthesis of Silver Nanoparticles and Their Immobilization in the Mycelial Matrix: A Novel Biological Approach to Nanoparticle Synthesis*. DOI: 10.1021/nl0155274. ISBN 10.1021/nl0155274. Dostupné také z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/nl0155274>
- [16] PLESSER, Hans E. *Reproducibility vs. Replicability: A Brief History of a Confused Terminology*. DOI: 10.3389/fninf.2017.00076. ISBN 1662-5196. Dostupné také z: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fninf.2017.00076/full>
- [17] HEJSKOVÁ, Veronika. *UV-VIS spektrofotometrie a možnosti jejího využití v rámci vž elávání učitelů chemie*. Praha, 2016, 107. Diplomová práce, Univerzita Karlova v Praze, vedoucí práce Ing. Hana KOTOUČOVÁ, PhD.
- [18] ZEIRI, Yehuda, Paz ELIA, Raya ZACH, Sharon HAZAN, Sofiya KOLUSHEVA a Ze'ev PORAT. *Green synthesis of gold nanoparticles using plant extracts as reducing agents*. DOI: 10.2147/IJN.S57343. ISBN 10.2147/IJN.S57343. Dostupné také z:

<http://www.dovepress.com/green-synthesis-of-gold-nanoparticles-using-plant-extracts-as-reducing-peer-reviewed-article-IJN>

- [19] AHMAD, Nabeel, Sharad BHATNAGAR, Ritika SAXENA, Danish IQBAL, A.K. GHOSH a Rajiv DUTTA. *Biosynthesis and characterization of gold nanoparticles: Kinetics, in vitro and in vivo study*. DOI: 10.1016/J.MSEC.2017.03.282. ISBN 10.1016/j.msec.2017.03.282. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0928493116326583>
- [20] RASAEI, Iman, Maryam GHANNADNIA, Saeed BAGHSHAHI, Danish IQBAL, A.K. GHOSH a Rajiv DUTTA. *Biosynthesis of silver nanoparticles using leaf extract of *Satureja hortensis* treated with NaCl and its antibacterial properties: A review of literature, factors affecting synthesis, characterization techniques and applications*. DOI: 10.1016/J.MICROMESO.2018.01.032. ISBN 10.1016/j.micromeso.2018.01.032. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1387181118300477>
- [21] VIJAYARAGHAVAN, K., T. ASHOKKUMAR, Ritika SAXENA, Danish IQBAL, A.K. GHOSH a Rajiv DUTTA. *Plant-mediated biosynthesis of metallic nanoparticles: A review of literature, factors affecting synthesis, characterization techniques and applications*. DOI: 10.1016/J.JECE.2017.09.026. ISBN 10.1016/j.jece.2017.09.026. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2213343717304645>
- [22] BASNET, Parita, T. INAKHUNBI CHANU, Dhrubajyoti SAMANTA a Somenath CHATTERJEE. A review on bio-synthesized zinc oxide nanoparticles using plant extracts as reductants and stabilizing agents. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 142. 2015, 73-79. DOI: 10.1016/J.JPHOTOBIO.2018.04.036. ISBN 10.1016/j.jphotobiol.2018.04.036. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1011134417314033>
- [23] ZHAO, Chengbo, Xunxiang ZHANG a Yumei ZHENG. *Biosynthesis of polyphenols functionalized ZnO nanoparticles: Characterization and their effect on human pancreatic cancer cell line*. DOI: 10.1016/J.JPHOTOBIO.2018.04.031. ISBN 10.1016/j.jphotobiol.2018.04.031. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1011134418303476>

- [24] NADAF, Nilofar Yakub, Shivangi Shivraj KANASE, Raya ZACH, Sharon HAZAN, Sofiya KOLUSHEVA a Ze'ev PORAT. *Biosynthesis of gold nanoparticles by Bacillus marisflavi and its potential in catalytic dye degradation*. DOI: 10.1016/j.arabjc.2016.09.020. ISBN 10.1016/j.arabjc.2016.09.020. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1878535216301642>
- [25] NARAYANAN, K.B. and N. Sakthivel, *Extracellular synthesis of silver nanoparticles using the leaf extract of Coleus amboinicus Lour*. Materials Research Bulletin, 2011. 46(10): p. 1708-1713.
- [26] SINGH, A., et al., *Biosynthesis of gold and silver nanoparticles by natural precursor clove and their functionalization with amine group*. Journal of Nanoparticle Research, 2010. 12(5): p. 1667-1675.
- [27] AHMAD, Tausif, Mohamad Azmi BUSTAM, Muhammad IRFAN, Muhammad MONIRUZZAMAN, Hafiz Muhammad ANWAAR ASGHAR a Sekhar BHATTACHARJEE. *Green synthesis of stabilized spherical shaped gold nanoparticles using novel aqueous Elaeis guineensis (oil palm) leaves extract: A review of literature, factors affecting synthesis, characterization techniques and applications*. DOI: 10.1016/J.MOLSTRUC.2017.11.095. ISBN 10.1016/j.molstruc.2017.11.095. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022286017315831>
- [28] VAZQUEZ-MUÑOZ, Roberto, Belen BORREGO, Karla JUÁREZ-MORENO, Maritza GARCÍA-GARCÍA, Josué D. MOTA MORALES, Nina BOGDANCHIKOVA a Alejandro HUERTA-SQUERO. *Toxicity of silver nanoparticles in biological systems: Does the complexity of biological systems matter?*. DOI: 10.1016/J.TOXLET.2017.05.007. ISBN 10.1016/j.toxlet.2017.05.007. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378427417301844>
- [29] BEATTIE, I. R. and R. G. Haverkamp (2011). *"Silver and gold nanoparticles in plants: sites for the reduction to metal."* Metallomics 3(6): 628-632.
- [30] ŽUREK, Michal. *Využití rostlin v přípravě nanočástic*, Brno, 2015, 68. Diplomová práce, Masarykova univerzita Brno, vedoucí práce prof. Ing. René KIZEK, PHD.

- [31] N.C. Sharma, S.V. Sahi, S. Nath, J.G. Parsons, J.L. Gardea-Torresdey, and T. Pal, *Synthesis of plant-mediated gold nanoparticles and catalytic role of biomatrix-embedded nanomaterials*, Environ. Sci. Technol. 41 (2007), pp. 5137–5142
- [32] JHA, A. K., K. Prasad, K. Prasad and A. Kulkarni (2009). *Plant system: nature's nanofactory*. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 73(2): 219-223.
- [33] S. SHANKAR, L. Jaiswal, R.S.L. Aparna, R.G.S. V Prasad, *Synthesis, characterization, in vitro biocompatibility, and antimicrobial activity of gold, silver and gold silver alloy nanoparticles prepared from Lansium domesticum fruit peel extract*, Mater. Lett. 137 (2014) 75–78, <http://dx.doi.org/10.1016/j.matlet.2014.08.122>.
- [34] B. ANKAMWAR, *Biosynthesis of gold nanoparticles (Green-gold) using leaf extract of Terminalia catappa*, E-J. Chem. 7 (2010) 1334–1339, <http://dx.doi.org/10.1155/2010/745120>.
- [35] HUANG JL, Li QB, Sun DH, Lu YH, Su YB, Yang X, et al. *Biosynthesis of silver and gold nanoparticles by novel sundried Cinnamomum camphora leaf*. Nanotechnology 2007;18. <http://dx.doi.org/10.1088/0957-4484/18/10/105104>. [article 105104].
- [36] PATIL, R.S., Kokate, M.R. and Kolekar, S.S. *Bioinspired synthesis of highly stabilized silver nanoparticles using Ocimum tenuiflorum leaf extract and their antibacterial activity*. Spectrochimica Acta A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy 91, 234–238, 2012
- [37] SINGH, J.D., Upadhyay, M.K., Khandelwal, N., Verma, H.N. and Dig, J. (2010) *Green synthesis of silver nanoparticles using Argimone mexicana leaf extract and evaluation of their antimicrobial activities*. Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures 5(2), 483–489
- [38] M.M.H. Khalil, E.H. Ismail, F. El-Magdoub, *Biosynthesis of Au nanoparticles using olive leaf extract*. 1st Nano Updates, Arab. J. Chem. 5 (2012) 431–437, <http://dx.doi.org/10.1016/j.arabjc.2010.11.011>.

- [39] N.U. Islam, K. Jalil, M. Shahid, A. Rauf, N. Muhammad, A. Khan, M.R. Shah, M.A. Khan, *Green synthesis and biological activities of gold nanoparticles functionalized with Salix alba*, Arab. J. Chem. (2015), <http://dx.doi.org/10.1016/j.arabjc.2015.06.025>
- [40] YUAN, Chun-Gang, Can HUO, Shuixin YU, Bing GUI, A. GNANAMANI a P. SENTHILKUMAR. *Biosynthesis of gold nanoparticles using Capsicum annuum var. grossum pulp extract and its catalytic activity: A review of literature, factors affecting synthesis, characterization techniques and applications*. DOI: 10.1016/J.PHYSE.2016.08.010. ISBN 10.1016/j.physe.2016.08.010. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1386947716308682>
- [41] AHMED, Shakeel, Can ANNU, Saiqa IKRAM a Salprima YUDHA S. *Biosynthesis of gold nanoparticles: A green approach*. DOI: 10.1016/j.jphotobiol.2016.04.034. ISBN 10.1016/j.jphotobiol.2016.04.034. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1011134416301324>
- [42] BAR, Harekrishna, Dipak K. BHUI, Gobinda P. SAHOO, Priyanka SARKAR, Santanu PYNE, Dipankar CHATTOPADHYAY a Ajay MISRA. *Synthesis of gold nanoparticles of variable morphologies using aqueous leaf extracts of Cocculus hirsutus*. DOI: 10.1080/17458080.2010.509875. ISBN 10.1080/17458080.2010.509875. Dostupné také z: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/17458080.2010.509875>
- [43] SVOBODNÍK, Tomáš. *Příprava a stabilizace nanočástic stříbra v systému voda-alkohol*. Olomouc, 2010, 51. Bakalářská práce, Univerzita Palackého v Olomouci, vedoucí práce doc. RNDr. Libor KVÍTEK, CSC.
- [44] PELÁNOVÁ, Silvie. *Stabilizace nanočástic stříbra pomocí přírodních vysokomolekulárních látek*. Olomouc, 2010, 82. Diplomová práce, Univerzita Palackého v Olomouci, vedoucí práce RNDr. Aleš PANÁČEK, PH.D.
- [45] ŘEZANKA, Pavel. Nanočástice – Nanočástice I. *KSICHT* [online]. [cit. 2018-03-17]. Dostupné z: <http://ksicht.natur.cuni.cz/serialy/nanocastice/1>
- [46] DODI, G., A. PALA, E. BARBU, D. PEPTANARIU, D. HRITCU, M.I. POPA a B.I. TAMBA. *Carboxymethyl guar gum nanoparticles for drug delivery applications*:

Preparation and preliminary in-vitro investigations. DOI: 10.1016/j.msec.2016.03.032.
 ISBN 10.1016/j.msec.2016.03.032. Dostupné také z:
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0928493116302041>

- [47] LAH N A C, JOHAN M R. *Facile shape control synthesis and optical properties of silver nanoparticles stabilized by Daxad 19 surfactant* [J]. Appl Surf Sci, 2011, 257: 7494–7500.
- [48] K. Safarova, A. Dvorak, R. Kubinek, M. Vujtek, A. Rek: Usage of AFM, SEM and TEM for the research of carbon nanotubes. Modern Research and Educational Topics in Microscopy, FORMATEX Microscopy Books, A. Mendéz-Vilas and J. Díaz (eds.). Vol.2, 2007. 513-519. ISBN-13: 978-84-611-9420-9.
- [49] ČECH BARABASZOVÁ, Karla. *Vybrané instrumentální metody analýzy materiálů a nanomateriálů*. Brno: Akademické nakladatelství CERM, 2012. ISBN 978-80-7204-810-6.
- [50] SANKHLA, Aryan, Rajeshwar SHARMA, Raghvendra Singh YADAV, Diwakar KASHYAP, S.L. KOTHARI a S. KACHHWAHA. *Biosynthesis and characterization of cadmium sulfide nanoparticles – An emphasis of zeta potential behavior due to capping*. DOI: 10.1016/J.MATCHEMPHYS.2015.12.017. ISBN 10.1016/j.matchemphys.2015.12.017. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0254058415304922>
- [51] SIVAMAI P, Thanighaiarassu RR. *Green Synthesis of Gold Nanoparticles Characterization by using Plant Essential Oil Menthapiperita and their Antifungal Activity against Human Pathogenic Fungi*. DOI: 10.4172/2157-7439.1000229. ISBN 10.4172/2157-7439.1000229. Dostupné také z: <https://www.omicsonline.org/open-access/green-synthesis-of-gold-nanoparticles-characterization-by-using-plant-essential-oil-menthapiperita-and-their-antifungal-activity-against-human-pathogenic-fungi-2157-7439.1000229.php?aid=30724>
- [52] KUMAR, Brajesh, Kumari SMITA, Luis CUMBAL, Javier CAMACHO, Elisabeth HERNÁNDEZ-GALLEGOS, María DE GUADALUPE CHÁVEZ-LÓPEZ, Marcelo GRIJALVA a Kleber ANDRADE. *One pot phytosynthesis of gold nanoparticles using*

Genipa americana fruit extract and its biological applications: A review of literature, factors affecting synthesis, characterization techniques and applications. DOI: 10.1016/J.MSEC.2016.02.029. ISBN 10.1016/j.msec.2016.02.029. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0928493116301229>

[53] SANKHLA, Aryan, Rajeshwar SHARMA, Raghvendra Singh YADAV, Diwakar KASHYAP, S.L. KOTHARI a S. KACHHWAHA. *Biosynthesis and characterization of cadmium sulfide nanoparticles – An emphasis of zeta potential behavior due to capping: A review of literature, factors affecting synthesis, characterization techniques and applications*. DOI: 10.1016/J.MATCHEMPHYS.2015.12.017. ISBN 10.1016/j.matchemphys.2015.12.017. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0254058415304922>

[54] LIU, Yee-Shing, Yung-Chung CHANG, Hui-Huang CHEN, Diwakar KASHYAP, S.L. KOTHARI a S. KACHHWAHA. *Silver nanoparticle biosynthesis by using phenolic acids in rice husk extract as reducing agents and dispersants: A review of literature, factors affecting synthesis, characterization techniques and applications*. DOI: 10.1016/J.JFDA.2017.07.005. ISBN 10.1016/j.jfda.2017.07.005. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1021949817301424>

[55] FRIEDRICH, Daniel. *Optické vlastnosti zlatých nanočástic*. SlidePlayer [online]. [cit. 2018-04-20]. Dostupné z: <http://slideplayer.cz/slide/12711096/>

[56] KNOBLOCHOVÁ, Lucie. *Zlaté nanočástice jako nástroj cílené terapie nádorových onemocnění*. Praha, 2013, 35. Bakalářská práce, Univerzita Palackého v Olomouci, vedoucí práce MUDr. Zdeněk HODNÝ, CSC.

[57] WANG S, Chen KJ, Wu TH, Wang H, Lin WY, Ohashi M, Chiou PY, Tseng HR, 2010; Photothermal effects of supramolecularly assembled gold nanoparticles for the targeted treatment of cancer cells. *Angewandte Chemie International Edition*, roč. 49, č. 22, 3777-3781

[58] Tecnicall: Čtvrtletník českého vysokého učení technického v Praze. Tecnicall [online]. 2009-2014 [cit. 2018-03-08]. Dostupné z: <http://www.tecnical.cz/clanek/2012-01-zlato/>

- [59] EGEBLAD, K., J. RASS-HANSEN, CH. C. MARSDEN, E. TAARNING a C. HVIID CHRISTENSEN. *Heterogeneous catalysis for production of value-added chemicals from biomass*. V: Catalysis. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2009. Editoři: J. J. Spivey, Mayank Gupta, Yi-Fan Han. ISBN 978-0-85404-249-4.
- [60] ISHIDA, Tamao, Hiroaki KOGA, Mitsutaka OKUMURA a Masatake HARUTA. *Advances in Gold Catalysis and Understanding the Catalytic Mechanism*. DOI: 10.1002/tcr.201600046. ISBN 10.1002/tcr.201600046. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/tcr.201600046>
- [61] INGOLE, Vijay Hiran. *Green-Synthesis of nano-hydroxiapatite using eggshell waste*. Maharashtra, India, 2015. Diplomová práce. Shivaji University.
- [62] LIU, Yee-Shing, Yung-Chung CHANG a Hui-Huang CHEN. *Silver nanoparticle biosynthesis by using phenolic acids in rice husk extract as reducing agents and dispersants*. DOI: 10.1016/j.jfda.2017.07.005. ISBN 1021-9498. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1021949817301424>
- [63] FRDLÍKOVÁ, Markéta a RNDR. RADIM J. VAŠUT, PH.D. Srovnání morfologie příčných řezů jehlic smrků (rod *Picea*). 2013, 1 - 55.
- [64] KISELEV, K.V., V.P. GRIGORCHUK, Z.V. OGNEVA, A.R. SUPRUN a A.S. DUBROVINA. *Stilbene biosynthesis in the needles of spruce Picea jezoensis*. Phytochemistry 131 (2016) 57 - 67.
- [65] BHATTACHARJEE, Sourav, Yung-Chung CHANG a Hui-Huang CHEN. *DLS and zeta potential – What they are and what they are not?*. DOI: 10.1016/J.JCONREL.2016.06.017. ISBN 0168-3659. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168365916303832>